

THESE

présentée devant l'Université de Nancy I

pour obtenir le grade de

Docteur d'Etat ès-Sciences Naturelles

par

Renée HATIER

Attachée de Recherches au C.N.R.S.

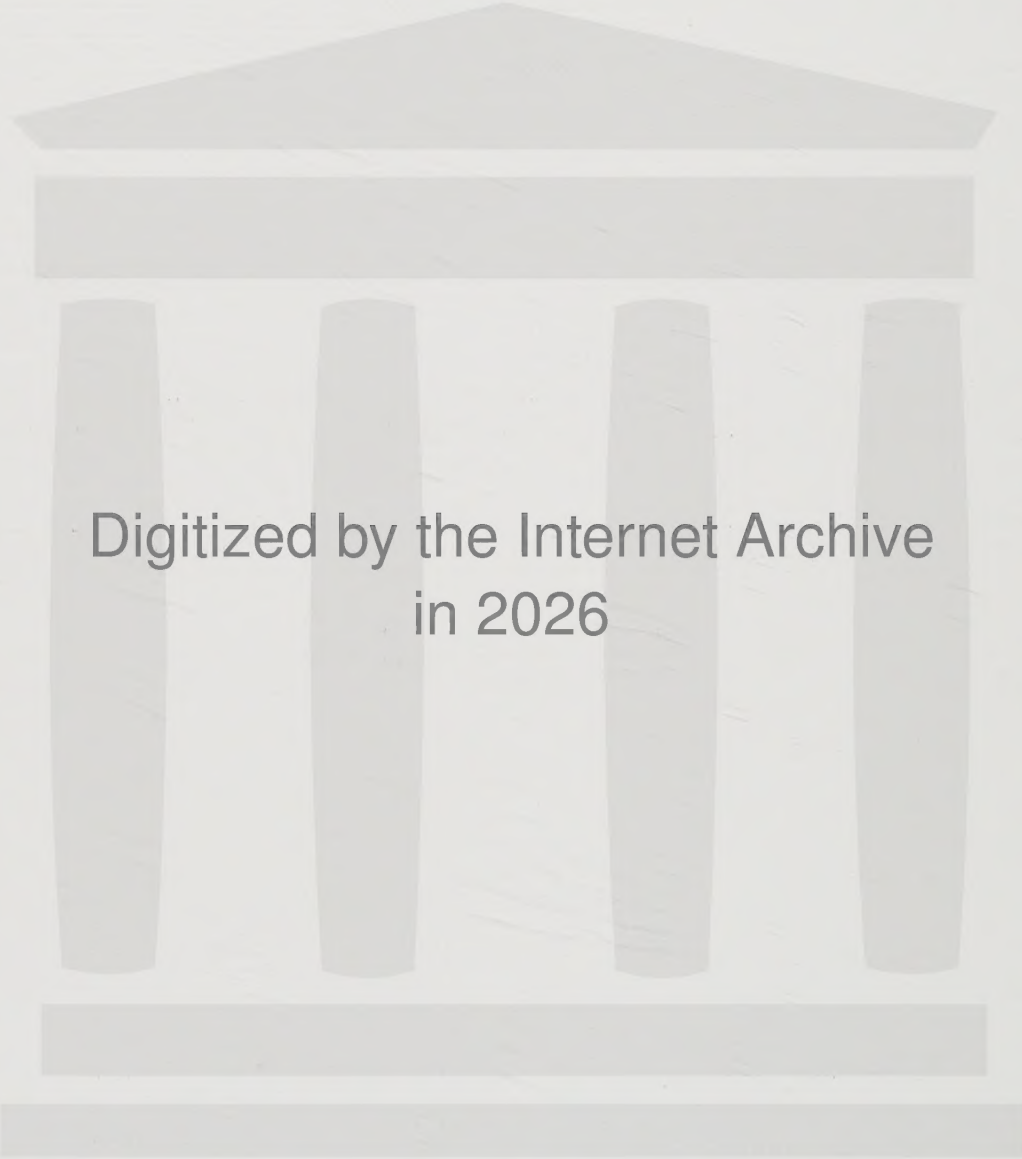
CONTRIBUTION A L'ETUDE DU DEVELOPPEMENT ET
DE LA CYTOPHYSIOLOGIE DE LA GLANDE SURRENALE
DE L'EMBRYON DE POULET

SOUTENUE LE JUIN 1972, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Membres du Jury

Président: M. F. STEPHAN

Examineurs: MM. R. FRENTZ
A. DOLLANDER
G. GRIGNON



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551918_0021

THESE

présentée devant l'Université de Nancy I

pour obtenir le grade de

Docteur d'Etat ès-Sciences Naturelles

par

Renée HATIER

Attachée de Recherches au C.N.R.S.

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DU DEVELOPPEMENT ET
DE LA CYTOPHYSIOLOGIE DE LA GLANDE SURRENALE
DE L'EMBRYON DE POULET**

SOUTENUE LE JUIN 1972, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Membres du Jury

Président: M. F. STEPHAN

Examineurs: MM. R. FRENTZ
A. DOLLANDER
G. GRIGNON

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU DEVELOPPEMENT ET
DE LA CYTOLOGIE DE LA GONADE SURRENALE
DE L'EMBRION DE POISSON



UNIV. LEIDEN
BIBL.
1911

A NOTRE PRESIDENT DE THESE MONSIEUR LE PROFESSEUR STEPHAN

Il nous fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse. Il nous a toujours reçue avec beaucoup de bienveillance. Qu'il veuille bien trouver ici, l'expression de notre profonde gratitude.

A NOS JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR FRENTZ

Au seuil de nos études, nous avons pu bénéficier de la clarté et de la précision de son enseignement. Il nous fait maintenant l'honneur de juger cette thèse. Nous lui exprimons toute notre reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR DOLLANDER

Il nous a accueillie dans son laboratoire alors que nous nous intéressions à la recherche embryologique. Nous avons pu apprécier la richesse de ses connaissances, son humanité et sa bonté. Il nous a toujours manifesté une grande bienveillance. Qu'il veuille bien trouver ici, l'assurance de notre profonde reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR GRIGNON

Il nous a suggéré le sujet de ces recherches peu de temps après nous avoir accueillie dans le laboratoire qu'il venait de créer. C'est grâce à ses conseils, ses encouragements et son aide inlassable qu'il nous a été possible de mener à bien ce travail. Nous lui devons beaucoup et nous sommes heureuse de lui dire ici toute notre reconnaissance.

Nous remercions vivement tous ceux qui nous ont apporté leur collaboration, en particulier : Mademoiselle KARADJOFF

Madame SIMONETTI

Madame WEISS

Madame CROMER

Nous tenons également à remercier les laboratoires ENDOPANCRINE, BYLA, CHOAY, qui nous ont fourni gracieusement l'ACTH. Les laboratoires CIBA qui nous ont fourni gracieusement la Métopirone et le Serpasil nécessaires à ce travail.

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

PLAN

-:-:-:-

<u>INTRODUCTION</u>	p. 1
---------------------------	------

<u>HISTORIQUE</u>	p. 5
-------------------------	------

MATERIEL ET TECHNIQUES

I - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES CLASSIQUES	p. 15
---	-------

A) - Microscopie optique

B) - Microscopie électronique

II - TECHNIQUES HISTOCHIMIQUES	p. 16
--------------------------------------	-------

A) - Etude du tissu corticosurrénalien

1°) - Mise en évidence des lipides p. 17

2°) - Détection de l'acide ascorbique p. 19

3°) - Détection de l'activité $\Delta 5 - 3 \beta$
hydroxystéroïdodéshydrogénasique p. 20

Tableau récapitulatif p. 22 - 23

B) - Etude du tissu médullosurrénalien

1°) - Mise en évidence de la totalité des
catécholamines p. 24

2°) - Distinction de la Noradrénaline p. 25

Tableau récapitulatif p. 30 - 31

ORGANOGENESE

rappels concernant :

I - La situation et la morphologie de la glande	
adulte	p. 32
II - Son innervation	
III - Sa vascularisation	
IV - Organogenèse	p. 35
a) - Tissu cortical	
b) - Tissu médullaire	

HISTOGENESE DES CELLULES CORTICALES

I) - CARACTERES MORPHOLOGIQUES

A) - Introduction	p. 38
B) - Caractères morphologiques optiques	p. 41
C) - Caractères morphologiques ultrastructuraux ..	p. 42
D) - Discussion	
1°) - Problème de l'existence des cellules	
"claires" et des cellules "sombres"	p. 47
2°) - Evolution des caractères ultrastruc-	
turaux des organites cellulaires	p. 48

II - CARACTERES HISTOCHIMIQUES

A) - Introduction	p. 55
B) - Analyse des inclusions lipidiques	p. 57
C) - Détection de l'acide ascorbique	p. 62
D) - Détection de l'activité $\Delta 5 - 3 \beta$ Hydroxy- stéroïdodéshydrogénasique	p. 63
E) - Discussion	p. 64

HISTOGENESE DES CELLULES ADRENALES

I - CARACTERES MORPHOLOGIQUES

A) - Introduction	p. 67
B) - Résultats. Caractères ultrastructuraux	p. 69
C) - Discussion	p. 73

II - CARACTERES HISTOCHIMIQUES

A) - Introduction	p. 78
B) - Résultats	p. 80
1°) - Mise en évidence de l'ensemble des catécholamines	p. 80
2°) - Mise en évidence de la noradrénaline ...	p. 81
C) - Discussion	p. 87

ETUDE EXPERIMENTALE PORTANT SUR LES CELLULES CORTICALES

I - ACTION DE L'ACTH

A) - Introduction	p. 92
B) - Matériel et techniques	p. 94
C) - Résultats	
1°) - Microscopie optique	p. 95
2°) - Modifications ultrastructurales	p. 97
D) - Discussion	p. 98

II - ACTION DE LA METOPIRONE

A) - Introduction	p. 106
B) - Matériel et techniques	p. 108
C) - Résultats	
1°) - Microscopie optique	p. 108
2°) - Modifications ultrastructurales	p. 109
D) - Discussion	p. 110

ETUDE EXPERIMENTALE PORTANT SUR LES CELLULES ADRENALES

ACTION DE LA RESERPINE

A) - Introduction	p. 115
-------------------------	--------

B) - Matériel et techniques	p. 116
C) - Résultats	
1°) - Micorscopie optique	p. 117
2°) - Microscopie électronique	p. 119
<u>CONCLUSIONS</u>	p. 126
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	p. 129

-:-:-:-:-

REPARTITION DES PLANCHES

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

Planches	I	et	II		entre	p.	35	et	36
Planches	III	et	IV		entre	p.	42	et	43
Planche	V				entre	p.	44	et	45
Planche	VI				entre	p.	46	et	47
Planche	VII				entre	p.	58	et	59
Planche	VIII				entre	p.	59	et	60
Planches	IX	et	X		entre	p.	61	et	62
Planche	XI				entre	p.	63	et	64
Planche	XII				entre	p.	69	et	70
Planche	XIII				entre	p.	71	et	72
Planche	XIV				entre	p.	80	et	81
Planche	XV				entre	p.	82	et	83
Planche	XVI				entre	p.	83	et	84
Planches	XVII	et	XVIII		entre	p.	97	et	98
Planches	XIX	et	XX		entre	p.	109	et	110
Planches	XXI, XXII, XXIII	et	XXIV		entre	p.	119	et	120

REPARTITION DES PLANCHES

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

Planches I	et II	entre p. 35 et 36
Planches III	et IV	entre p. 42 et 43
Planche V		entre p. 44 et 45
Planche VI		entre p. 46 et 47
Planche VII		entre p. 58 et 59
Planche VIII		entre p. 59 et 60
Planches IX	et X	entre p. 61 et 62
Planche XI		entre p. 63 et 64
Planche XII		entre p. 69 et 70
Planche XIII		entre p. 71 et 72
Planche XIV		entre p. 80 et 81
Planche XV		entre p. 82 et 83
Planche XVI		entre p. 83 et 84
Planches XVII	et XVIII	entre p. 97 et 98
Planches XIX	et XX	entre p. 109 et 110
Planches XXI, XXII, XXIII et XXIV		entre p. 119 et 120

$\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{4}$

- Biosynthèse des catécholamines p. 9
- Biosynthèse des stéroïdes surrénaliens entre p. 13 et 14
- Vascularisation p. 33
- Morphogenèse des glandes surrénales chez l'embryon p. 34
- Schéma des volumes relatifs des constituants de la
glande surrénale p. 37
- Schéma reliant les différentes étapes de la synthèse
des stéroïdes aux organites cellulaires entre p. 38 et 39
- Schéma de l'axe hypophysosurrénalien p. 93
- Schéma du mode d'action de la Métopirone p. 106

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années l'étude de la maturation morphologique et fonctionnelle des glandes endocrines chez l'embryon et le fœtus a suscité un certain nombre de travaux. Il est apparu intéressant en effet, de rechercher quand et comment se mettent en place des structures et des fonctions qui sont essentielles chez l'adulte. Les données acquises sont destinées à faire mieux comprendre la physiologie foetale et néonatale d'une part, les corrélations endocriniennes de l'adulte d'autre part. En effet, ce que l'on pourrait appeler la "méthode embryologique" permet d'assister à l'installation progressive des différents éléments impliqués dans des processus endocriniens de plus en plus complexes. Il s'agit là d'un très vaste champ d'investigations qui appartient à ce que l'on a maintenant coutume d'appeler l'endocrinologie foetale.

Rechercher l'apparition des signes d'activité d'une glande endocrine implique nécessairement que l'on étudie les étapes de la différenciation de ses cellules et les facteurs de cette différenciation. En d'autres termes, des recherches sur des questions d'endocrinologie foetale sont aussi des recherches de biologie cellulaire en général et en particulier des recherches sur la différenciation cellulaire.

Fréquentant un laboratoire dont la plus grande partie de l'activité est consacrée précisément à des recherches sur la maturation du complexe hypothalamo-hypophysaire, nous avons été amenée à nous intéresser à ce complexe d'abord puis à l'un de ses "organes cibles" : la glande surrénale. L'objet de notre travail devenait donc l'étude de l'histogenèse, de la maturation de la glande surrénale et de l'ontogenèse de ses relations avec l'hypophyse.

La glande surrénale présente la particularité d'être constituée par deux parties de structures différentes, d'origines différentes et de significations fonctionnelles différentes. D'innombrables travaux lui ont été consacrés, la plupart du temps fragmentaires c'est à dire traitant de l'une ou de l'autre de ses parties. Certes son développement a été étudié par les embryologistes qui ont de longue date précisé son organogenèse. Plus rarement cependant, l'aspect fonctionnel ou cytophysiologique de ce développement a été étudié. Il nous est apparu intéressant d'entreprendre des recherches sur ce sujet, qui viendraient compléter celles qui étaient entreprises au laboratoire sur le complexe hypothalamo-hypophysaire, et apporter des données nouvelles sur la maturation de l'"axe" hypothalamo-hypophysosurrénalien.

Nous nous sommes donc adressée aux techniques histochimiques et aux techniques de la microscopie électronique pour rechercher quand les cellules corticales acquièrent les organites puis les inclusions spécifiques qui permettent de les considérer comme susceptibles d'élaborer des stéroïdes. En d'autres termes, nous avons voulu préciser l'installation d'un "état" potentiel du fonctionnement des cellules corticales. Grâce ensuite à une expérimentation qui nous a permis de stimuler de différentes manières les cellules, nous avons essayé de reconnaître à quelle époque de la vie embryonnaire elles sont capables de répondre à une stimulation. Enfin, la mise en jeu d'une stimulation de l'adénohypophyse donc la mise en jeu d'une stimulation des surrénales par de l'ACTH endogène devait nous amener à proposer une date où l'"axe" hypothalamo-hypophysosurrénalien est installé puis actif.

Chemin faisant nous nous sommes intéressée à d'autres questions: le problème des cellules claires et des cellules sombres de la cortico-surrénale, celui de la zonation de la surrénale chez les Oiseaux et plus généralement celui du rôle des organites dans la stéroïdogénèse. Les résultats que nous avons obtenus sont rapportés dans les première et troisième parties de notre travail.

La seconde partie est en effet consacrée à l'étude de l'histogénèse de la médullosurrénale. Il nous est apparu qu'il serait regrettable d'ignorer la partie non hypophyso-dépendante de la glande. En outre les cellules médullaires (cellules adrénales) ont des caractères cytologiques très intéressants. Si l'on connaît bien les étapes de la biosynthèse des catécholamines, la cytophysiologie de cette synthèse est encore controversée. Par ailleurs, toujours sur le plan cytologique, les différents auteurs ont des opinions différentes sur la signification fonctionnelle des cellules adrénales. En effet, les uns admettent qu'il existe des cellules à adrénaline et des cellules à noradrénaline, les autres estiment au contraire que la médullosurrénale possède une seule catégorie de cellules capables d'élaborer en proportions variables adrénaline et noradrénaline. Nous avons étudié la cytogénèse de la médullosurrénale en nous adressant aux techniques histochimiques susceptibles de nous permettre la distinction entre adrénaline et noradrénaline, les résultats obtenus venant compléter ceux de l'observation en microscopie électronique. Comme nous l'exposerons dans la seconde partie de notre travail, nous

avons obtenu grâce aux méthodes utilisées, de bons arguments en faveur de la théorie uniciste.

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons recherché quand ces cellules adrénales sont capables de réagir à une stimulation. Pour cela nous nous sommes adressée à la réserpine qui provoque une déplétion rapide et importante du contenu en grains de catécholamines. Cette expérimentation nous a amenée en outre à commenter les signes cytologiques d'activation des cellules adrénales.

HISTORIQUE

L'étude de la glande surrénale des Oiseaux a été moins souvent abordée que celle des Mammifères bien que de nombreuses publications aient été consacrées à son organogenèse et à son histophysiologie.

Du 16ème siècle au 18ème siècle des observations très diverses concernant les surrénales des Mammifères se sont accumulées, mais ce n'est qu'au début du 19ème siècle que des travaux d'anatomie comparée ont conclu à la dualité morphologique de cette glande. LEYDIG en 1853 dans un travail effectué chez les Poissons crée le terme "corps suprarénal" et BALFOUR en 1876 chez les Poissons distingue corps suprarénaux (ou tissu médullaire ou chromaffine) et corps interrénaux (ou tissu cortical).

Chez les Batraciens le tissu chromaffine est dispersé en îlots au sein du tissu cortical. On retrouve une organisation analogue chez les Reptiles où existe en plus de ces îlots un amas périphérique de tissu chromaffine.

Chez les Oiseaux les tissus cortical et chromaffine sont disposés en cordons ou îlots de cellules qui sont entremêlés.

Chez les Mammifères le tissu chromaffine est regroupé en une masse centrale ou médullaire (médullo-surrénale) entourée par le tissu cortical qui forme le cortex surrénal (cortico-surrénale).

A la fin du 19ème siècle, les recherches se sont surtout orientées vers l'embryologie comparée et l'origine des constituants de la surrénale, les publications qui concernent l'embryon d'Oiseau ont été très nombreuses.

TISSU CORTICAL

Plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que le tissu cortical venait de l'ectoblaste [JANOSIK (1883), MIHALKOVICS (1885), VALENTI (1889), FUSARI (1893) et GOORMAGHTIGH (1921)]. D'autres auteurs pensaient qu'il venait du mésoblaste [HIS (1868), WALDEYER (1870) et BRUNN (1872)]. Pour WELDON (1885) son origine était le mésonephros tandis que pour SEMON (1890) et RABL (1891) le pronephros donnait naissance aux cellules corticales.

Plusieurs auteurs ont observé chez l'embryon de Poulet des cellules corticales à des stades différents : GRAY (1852) 7ème jour d'incubation, REMAK (1855) au 15ème jour, BRUNN (1872), VALENTI (1889), RABL (1891), FUSARI (1893) et SOULIE (1903) les observent dès la 78ème heure. WELDON (1885), FUSARI (1893), SOULIE (1903), MINERVINI (1904), BREZZI (1940)

les observent dans le mésenchyme entre le mésonephros et l'aorte . SOULIE décrit des cordons corticaux de 30 à 50 μ de longueur situés dans le conjonctif au 5ème jour de l'incubation. HAYS (1914) a noté que ces masses étaient en relation avec l'épithélium coelomique par une travée de cellules.

WILLIER (1930) a obtenu un développement de l'ébauche surrénale corticale en greffant la partie du mésonephros antérieur comprenant un épaississement de l'épithélium coelomique, sur la membrane chorio allantoidienne d'embryon de Poulet. Les cellules corticales étaient donc localisées dans cet épaississement et l'auteur a pu conclure que l'ébauche de la corticale se différencie indépendamment des cellules sympathiques.

TISSU CHROMAFFINE OU MEDULLAIRE

D'origine neurectoblastique le tissu chromaffine provient de cellules issues des crêtes neurales. [FUSARI (1893), SOULIE (1903), HAYS (1914), RAU et JOHNSON (1923), HARRIS (1928), WILLIER (1930), HAMMOND et YNTEMA (1947)].

HARRIS (1928) a précisé que les cellules médullaires migraient ventralement par rapport aux troncs sympathiques de chaque côté de l'aorte. BRAUER (1932) pense que l'ébauche corticale droite qui se trouve très proche de l'aorte intercepte plus de cellules sympathiques que l'ébauche gauche plus éloignée de la voie de migration.

L'association entre les éléments médullaires et les éléments corticaux se produit entre le 4ème et le 5ème jour d'incubation pour FUSARI (1893) et GOORMAGHTIGH (1921), entre le 5ème et le 6ème jour pour HAYS (1914) et DAWSON (1953).

L'évolution ultérieure des ébauches initiales de la glande surrénale des Oiseaux a été étudiée par HAYS (1914), GOORMAGHTIGH (1921), WILLIER (1930), BRAUER (1932), KNOUFF et HARTMAN (1951), ROMANOFF (1960), SIVARAM (1965).

HAYS (1914) a noté que les cellules médullaires se groupent autour de vaisseaux sanguins veineux et qu'une capsule conjonctive commence à se développer au 7ème jour d'incubation. WILLIER (1930) précise que les cellules médullaires ne forment jamais tout à fait des cordons distincts mais des "files" ou des groupes ; il note également une différence de taille entre les ébauches surrénaliennes droite et gauche, l'ébauche droite étant la plus petite. En outre sur 13 greffes de mésonephros où la surrénale ne se développait pas,

l'auteur précise que 11 provenaient du mésonephros droit et 2 du mésonephros gauche.

MEDULLO-SURRENALE

Les premiers travaux histochimiques ont débuté avec les observations de VULPIAN (1856). Cet auteur avait constaté que le tissu médullaire de la surrénale de Mammifères ainsi que celui des Oiseaux (Poule, Mouette) était coloré en vert par le chlorure ferrique. Cette réaction ne se produisait qu'au niveau de la médullaire, et avec le sang de la veine efférente de la surrénale. Il proposa donc l'hypothèse selon laquelle les glandes surrénales seraient des "glandes dites sanguines c'est à dire versant directement dans le sang leur produit de sécrétion".

A cette observation s'ajouta celle de HENLE (1865) qui nota la coloration jaune-brune que prenait la médullo-surrénale après action du bichromate de potassium. Il appela cette coloration caractéristique "réaction chromaffine" pensant qu'elle était due à la formation d'un sel de chrome avec les produits d'oxydation du tissu médullaire. Cette coloration pouvait être éventuellement le résultat de l'oxydation des produits du tissu médullosurrénalien et n'était pas due à la formation de sels de chrome comme le croyait HENLE. Le terme de "réaction chromaffine" est si couramment utilisé dans les publications que son remplacement par le terme de "réaction phéochrome" n'est pas toujours appliqué.

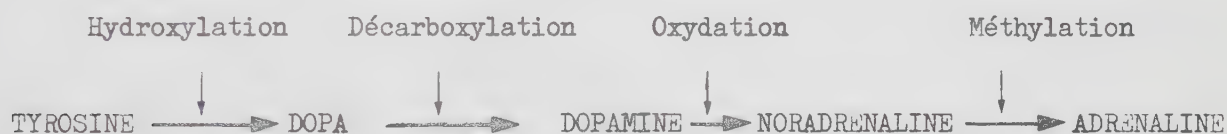
VON FURTH en 1897 isola un composé qu'il appela "suprarénine" et ABEL en 1899 prépara "l'épinéphrine" à partir d'un extrait surrénalien. En 1901 TAKAMINE donna le nom d'adrénaline à cette substance produisant des réactions spécifiques connues. Cette substance isolée et purifiée, sa composition chimique fut déterminée en 1903 par PAULY, et sa synthèse réalisée par STOLZ (1904) puis par DAKIN (1905). La noradrénaline étudiée par BARGER et DALE fut synthétisée en 1910.

Les observations histochimiques de mise en évidence des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) se sont multipliées : réaction argentaffine (OGATA 1923, KUTSCHERA-AICHBERGEN 1948), réaction à l'acide osmique, (GRYNFELT 1903, CRAMER 1918, GOORMAGHTIGH 1931), réaction phéochrome au bichromate de potassium (HENLE 1865, MULON 1904, OGATA 1923), réaction phéochrome à l'iodate de potassium (GERARD, CORDIER et LISON 1930, HILLARP et

HÖKFELT 1955).

Les résultats obtenus grâce à l'essor de nouvelles techniques : centrifugation différentielle, chromatographie, ont apporté des précisions sur les granules chromaffines, lieux de stockage des catécholamines responsables de ces réactions [HILLARP et HÖKFELT (1955, 1958, 1959), FALCK et Coll. (1956)] et ont montré qu'ils sont semblables aux granules denses observés en microscopie électronique. (LEVER 1955, SJÖSTRAND 1956, WETZSTEIN 1957, DE ROBERTIS et VAZ FERREIRA 1957).

Le schéma de la biosynthèse des amines établi par BLASCHKO en 1939 et par HOLTZ (1939) a été étudié par de nombreux auteurs grâce à l'utilisation des techniques de centrifugation différentielle en gradient de densité, de radio-isotopes, de chromatographie. Ils ont précisé les différentes étapes ainsi que les enzymes impliquées au cours de chacune d'elles. Les recherches cytologiques et histochimiques ont tenté ensuite de localiser les sites intracellulaires de chaque transformation.



La tyrosine puisée dans le sang est transformée en Dopa. (déhydroxy-phénylalanine) (BERTLER 1960).

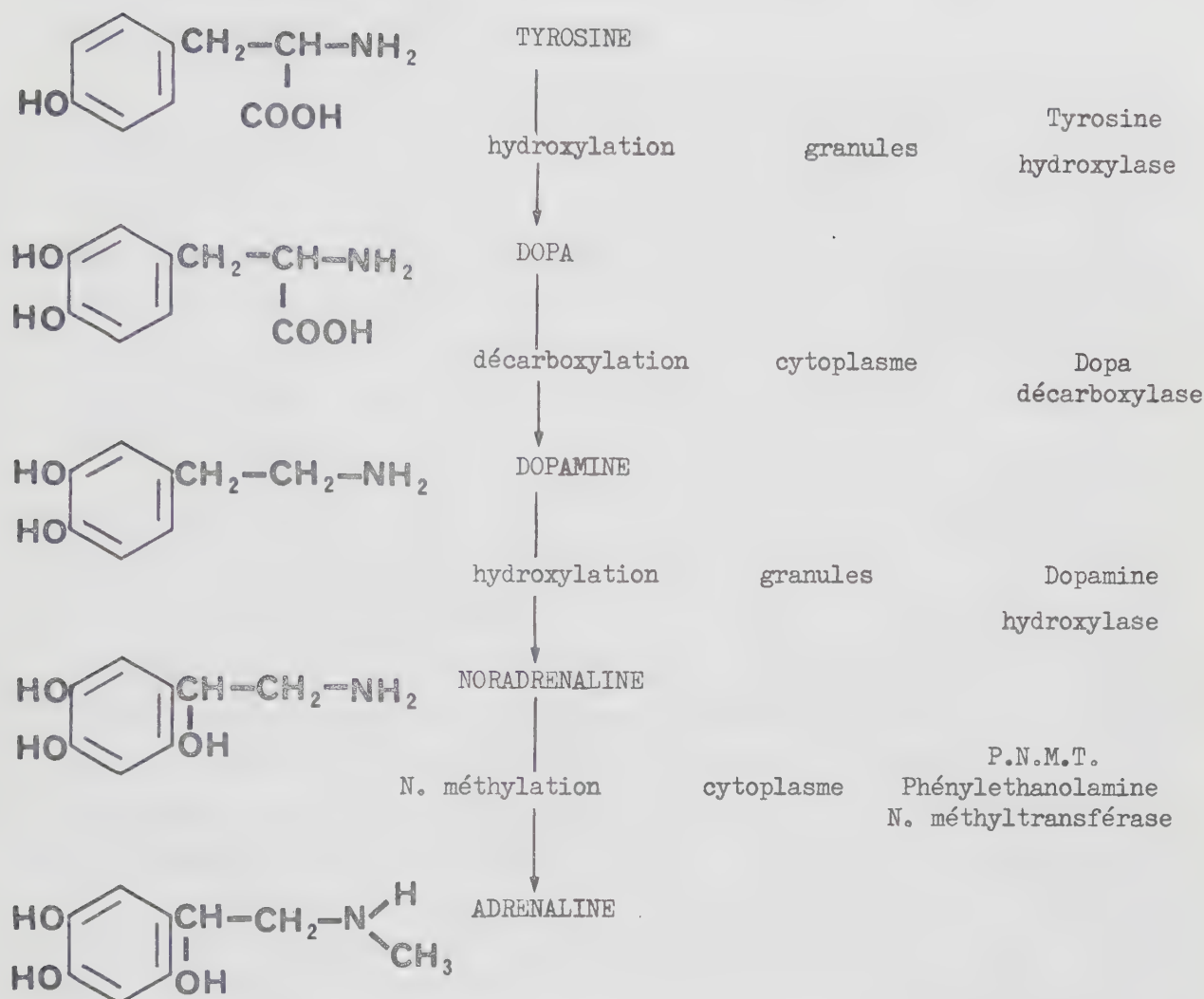
Des surrénales isolées et perfusées avec de la tyrosine, produisent de la noradrénaline et de l'adrénaline. (ROSENFELD, LEEPER et UDENFRIEND 1958). Des coupes de surrénales incubées avec de la tyrosine marquée en ^{14}C fournissent de l'adrénaline marquée.

La Dopa est transformée en dopamine par une Dopa-décarboxylase qui se trouve dans le hyaloplasme. (HAGEN 1956)

Des coupes de médullosurrénales incubées avec de la Dopa marquée fournissent de la dopamine, de la noradrénaline et de l'adrénaline marquées (HAGEN et WELCH 1955, DEMIS, BLASCHKO et WELCH 1956).

La dopamine se trouve au niveau des grains (BERTLER 1960-1961) de même que l'enzyme d'hydroxylation qui la transforme en noradrénaline (KIRSHNER 1962) c'est donc dans les grains que se ferait cette oxydation (LEVIN, LEVENBERG et KAUFMAN 1960).

TABEAU I Biosynthèse des catécholamines



La noradrénaline est ensuite méthylée en adrénaline. L'enzyme de méthylation est cytoplasmique. La noradrénaline doit donc quitter le grain pour être méthylée (BLASCHKO 1959, HAGEN 1959, BERTLER 1960, KIRSHNER 1960). L'adrénaline cytoplasmique est ensuite stockée dans les grains.

De l'adrénaline a été obtenue à partir d'incubation de broyats de médullo-surrénale en présence de noradrénaline (VINET 1940, KIRSHNER et GOODALL 1957, PICARD et VITRY 1964, CIER et PEYRIN 1962, HERMANN, PEYRIN et CIER 1963).

La noradrénaline peut également être stockée dans les grains sans être méthylée. Selon BERTLER (1960) les grains stockent adrénaline et noradrénaline sans distinction, mais par ultracentrifugation, différents auteurs :

EADE (1956-1958), SCHUMANN (1957), FORTIER (1959) ont réussi à isoler deux types de grains : les uns constitués de noradrénaline, les autres constitués d'adrénaline avec une certaine quantité de noradrénaline (SCHUMANN 1957, HAGEN 1959, HILLARP 1960).

Les catécholamines stockées dans les grains sont liées à un complexe qui permet le maintien de ces grains dans le cytoplasme. HILLARP (1958, 1959, 1960), BLASCHKO, HAGEN et WILCH (1955) avaient remarqué qu'il fallait lyser les grains pour en obtenir un dosage de catécholamines. Ce complexe renfermerait de l'ATP et des protéines selon HAGEN (1960), des lipoprotéines selon KONSCHIEGG (1940) et HILLARP (1960), des phospholipides selon KUTSCHERA et AICHBERGEN (1948). En 1960 VITRY, CHAMBOST et PICARD ont montré que des phospholipides entraient bien dans la composition de ce complexe. Le support des amines est phospholipoprotéique VITRY (1966).

Le problème de la sécrétion médullosurrénalienne a été étudié sous différents aspects par plusieurs auteurs dont BÄNDER (1950), HILLARP et HÖKFELT (1953), ERANKÓ (1955a), PICARD et VITRY (1964).

Les réactions histochimiques ont montré que les catécholamines étaient localisées dans des cellules différentes. On s'est donc demandé si des catégories cellulaires distinctes excrétaient électivement l'adrénaline ou la noradrénaline. En 1950 PICARD avait mis en évidence deux catégories de cellules après réaction phéochrome. Cette réaction permettait de distinguer des cellules rhagiochromes (cellules chromophobes) et des cellules hyalochromes (cellules chromophiles). Plusieurs auteurs admettent une conception dualiste selon laquelle la noradrénaline est élaborée par toutes les cellules, une catégorie cellulaire l'excrète sous cette forme et une autre catégorie cellulaire qui possède seule, l'enzyme de méthylation, la transforme enadrénaline. PICARD et VITRY (1964) de leur côté proposent une conception uniciste. Après une étude biochimique des deux catégories cellulaires, ces auteurs ont montré que les cellules rhagiochromes ne sont pas des "cellules à noradrénaline" exclusivement. Elles contiennent à la fois de l'adrénaline et de la noradrénaline.

Ces mêmes auteurs ont ensuite montré que les cellules rhagiochromes étaient capables de méthyler la noradrénaline enadrénaline, elles possèdent donc l'enzyme de méthylation comme les cellules hyalochromes mais dans cette dernière catégorie cellulaire le rendement de méthylation est meilleur et le

pourcentage d'adrénaline plus élevé. Ce rendement de méthylation dépend de conditions d'oxygénation et de vascularisation.

Pour PICARD et VITRY (1964) "Les données histologiques, ultrastructurales et biochimiques concordent avec la physiologie, pour faire admettre que toute la médullaire est orientée vers une seule fonction endocrine : la fourniture d'adrénaline". "Il est de plus en plus certain que le dimorphisme cellulaire n'exprime nullement une différenciation spécifique de deux catégories cellulaires en vue de sécrétions différentes".

Dans la médullo-surrénale l'identification de types cellulaires élaborant et stockant les deux catécholamines : adrénaline et noradrénaline a été le sujet de nombreuses investigations : BÄNDER (1950-1954), KLEIN et KRACHT (1957) rapportent la présence de deux types de cellules médullaires et pensent que l'une correspond à la présence d'adrénaline et l'autre à celle de noradrénaline, mais aucun d'entre eux ne démontre cette hypothèse.

WOOD en 1962 à l'aide de techniques de colorations différentielles apporte la preuve que deux types de cellules distinctes par la taille de leurs granules sont en relation avec la présence d'adrénaline et de noradrénaline.

HAGEN et BARNETT (1960) ont distingué différents types cellulaires dans la médullo-surrénale du boeuf, certains renfermant des granules de grande taille, d'autres de petite taille, d'autres enfin des granules de taille variable. Puis ils ont étudié en microscopie électronique les granules de catécholamines isolés après centrifugation différentielle. Ces auteurs ont montré que la fraction granulaire de grande taille renfermait principalement de la noradrénaline tandis que les petits granules étaient riches en adrénaline.

L'introduction de la double fixation glutaraldéhyde-acide osmique en microscopie électronique fait apparaître des différences structurales entre les deux types de grains : des grains à contenu osmiophile très dense et de forme variable décrits comme riches en noradrénaline et des grains à contenu moins dense et généralement arrondis avec une structure plus ou moins granulaire, interprétés comme des grains riches en adrénaline. Ces deux types de grains ont été observés chez de nombreuses espèces mais chez certaines les deux types de grains coexistent dans la même cellule, ex. chez le Rat (COTTE, MICHEL-BECHET, PICARD et HAON 1966).

CORTICO SURRENALE

Les travaux biochimiques concernant le cortex surrénal commencèrent plus tardivement que ceux traitant de la médullo-surrénale. Les premières observations reconnurent la nature lipidique des granulations du cortex : SIMON (1845), VON ECKER (1846) puis ALEXANDER (1892), KAISERLING et ORGLER (1900), MULON (1902) étudièrent les propriétés de cette "graisse" (réduction de l'acide osmique, biréfringence, solubilité dans l'acétone). ALEXANDER attribua ces propriétés à la lécithine et MULON conclut que c'était une glande lécithinogène.

CHAUFFARD (1912) considéra ces inclusions comme étant de nature cholestérique. BIEDL (1903) DA COSTA (1911) MAYER (1912) ont montré que les inclusions graisseuses du cortex sont un mélange de graisses neutres, d'acides gras, de cholestérol, de lécithine, et de stéroïdes. Ces corps sont très miscibles et dans des proportions variables suivant les espèces.

Sur le plan physiologique, les travaux de BIEDL (1910) sur les corps interréniaux des Squales, des Torpilles et des Raies précisèrent le rôle indispensable du cortex surrénal dans le maintien de la vie. A la suite de ces résultats, des expériences entreprises chez les Mammifères confirmèrent la fonction essentielle du cortex. Les travaux biochimiques se développèrent : en 1929, HARTMANN prépara un extrait hydrosoluble de corticosurrénale qu'il appela "cortine" et en 1931 SWINGLE et PFITFNER préparèrent des extraits liposolubles.

En 1934 KENDALL découvrit la cortisone. Le nom général de stéroïde fut introduit en 1936 pour dénommer tous les composés dont la structure était de type stérol. En 1937 STEIGER et REICHSTEIN synthétisèrent la DOCA. On isola peu à peu les hormones du cortex surrénal de Mammifères qui sont toutes des stéroïdes : des corticoïdes agissant sur les métabolismes protidique, glucidique, hydroélectrolytique, des androgènes, des progestagènes et des oestrogènes. Les hormones sexuelles (oestrone, androstérone, testotérone et progestérone) dont la structure fut élucidée, furent isolées en très petites quantités. Le développement de nouvelles méthodes : chromatographie sur papier et spectroscopie infra-rouge permirent de poursuivre les études biochimiques. Ces mêmes techniques ainsi que l'emploi de radio-isotopes prouvèrent la filiation des hormones stéroïdes à partir de cholestérol marqué. Il devint aussi

possible d'identifier dans les urines des métabolites marqués des hormones stéroïdes. Cette filiation a également été démontrée à partir d'acétate marqué.

Les glandes surrénales sont capables d'élaborer des stéroïdes différents à partir de cholestérol, précurseur commun ; cette différenciation est liée à la présence d'enzymes particuliers : les hydroxylases.

Il nous paraît opportun de rapporter brièvement les différentes étapes de la stéroïdogénèse au niveau de la glande surrénale. (voir schéma page suivante)

Les nombreuses études histophysiologiques que nous ne citerons pas volontairement, ont abouti à l'hypothèse de la zonation fonctionnelle du cortex surrénal "zonal theory" (DEANE et Coll. 1946, 1947, 1948 ; CHESTER JONES 1948). Chaque couche de la corticosurrénale (glomérulée, fasciculée, réticulée) sécrèterait des stéroïdes spécifiques : la glomérulée sécrèterait des minéralocorticoïdes, la fasciculée des glucocorticoïdes, tandis que les hormones androgènes seraient élaborées par la réticulée. En réalité il ne semble pas que la zonation morphologique et histologique corresponde à une zonation fonctionnelle aussi rigoureuse.

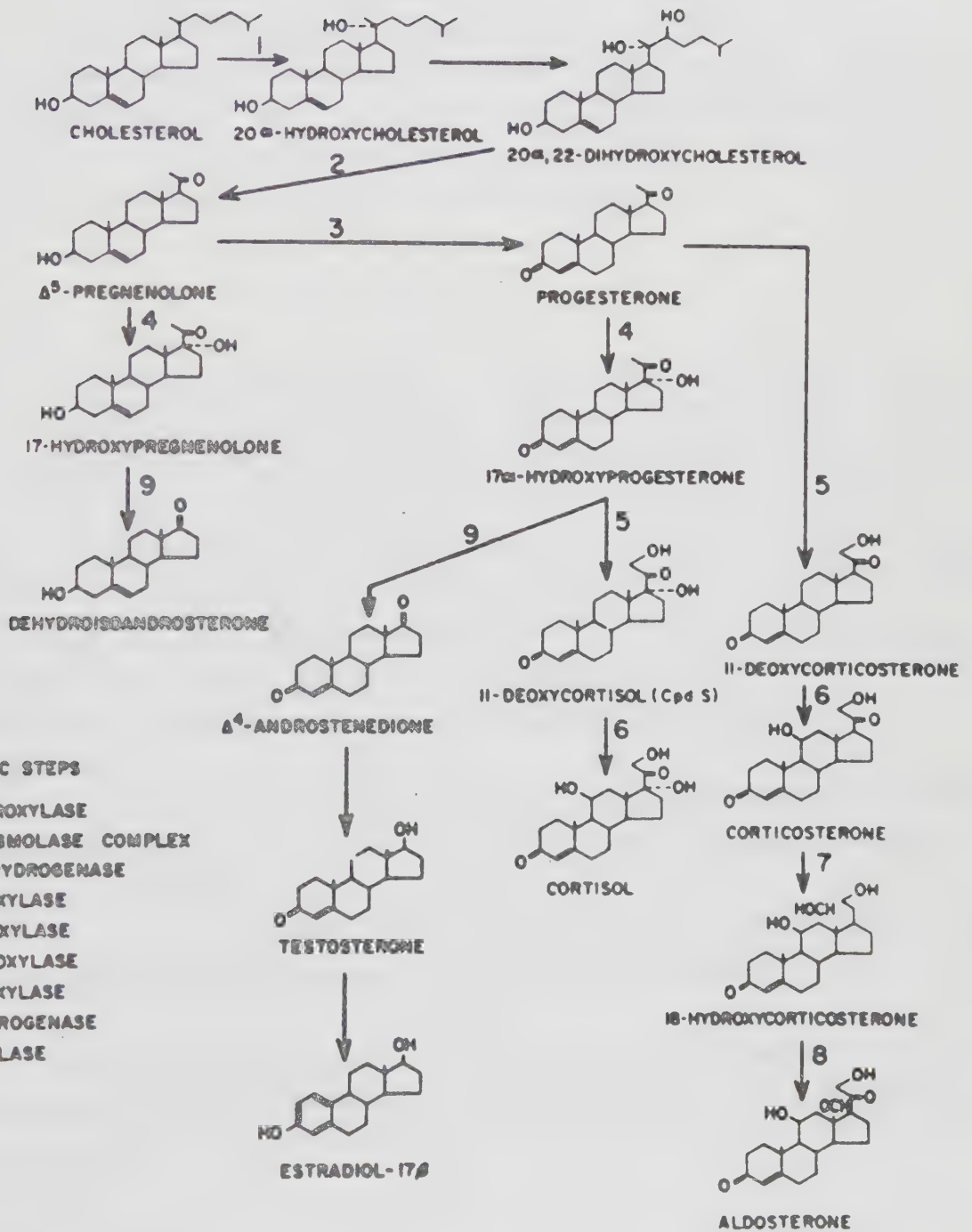
Par incubation des différentes zones du cortex surrénal, les travaux de AYRES et Coll. (1956), GIROUD et Coll. (1958), SHEPPARD et Coll. (1963) ont montré que l'aldostérone était élaborée par la glomérulée, la corticostérone et l'hydrocortisone étaient élaborées par les zones fasciculée et réticulée et la 11 β hydroxyandrosténone par la zone réticulée.

La 17 α hydroxylase est retrouvée dans les zones fasciculée et réticulée (AYRES et Coll. 1956, GRANT 1962).

La 21 hydroxylase et la 11 β hydroxylase sont présentes dans toutes les zones, tandis que la 18 hydroxylase est localisée à la glomérulée (GRANT 1962).

SYMINGTON (1962) a émis l'hypothèse que la réticulée est capable de synthétiser tous les stéroïdes sauf l'aldostérone et que la fasciculée avait une fonction de stockage. Les zones fasciculée et réticulée élaboreraient le cortisol et les androgènes (GRIFFITH 1963).

Parmi ces stéroïdes, le cortex surrénal de l'Homme synthétise surtout du cortisol tandis que chez le Lapin et le Rat la corticostérone est prépondérante (BUSH 1953, 1955, ROMANOFF et Coll. 1955), chez les Oiseaux, la corticostérone est l'hormone surrénalienne la plus abondante dans le sang péri-



Biosynthèse des stéroïdes surrénaliens
d'après TEMPLE et LIDDLE (1970)

phérique (PHILLIPS et CHESTER JONES 1957).

La présence de cortisol chez les Oiseaux est discutée depuis 1957. Les auteurs précédents ont mis en évidence dans le sang efférent de la surrénale du Poulet la présence de traces de 17 céstéroïdes (cortisol et cortisone).

URIST et DEUTSCH (1960) ont confirmé ces faits par dosage de ces hormones dans le sang périphérique du Poulet. In vitro, DE ROOS (1960) a obtenu la production de traces de cortisol par des glandes surrénales de Poulet, tandis que NAGRA (1960) n'en a pas décelé dans le sang veineux surrénalien.

L'aldostérone est également présente chez le Poulet : DE ROOS (1961) en a obtenu in vitro la production de petites quantités.

Au terme de l'exposé succinct de la chronologie des différents travaux effectués sur la glande surrénale, il nous paraît opportun de souligner certains points importants avant de rapporter nos propres recherches.

Les publications relatives à la surrénale embryonnaire ont été particulièrement nombreuses à la fin du 19ème siècle. L'origine des constituants fondamentaux de la glande, leur évolution, leurs principaux caractères morphologiques ont été assez rapidement décrits. Les recherches deviennent alors moins nombreuses mais surtout leurs orientations ont été peu à peu modifiées. D'une manière schématique elles ont été les suivantes :

- Etudes histochimiques des cellules corticales et des cellules médullaires progressant en même temps que des techniques nouvelles ou plus fidèles étaient mises au point.

- Etude de la maturation fonctionnelle des surrénales et de l'axe hypothalamo-hypophysaire par des méthodes expérimentales.

Nous aurons tout loisir d'analyser les travaux effectués chez l'embryon dans les chapitres à venir au cours desquels nous exposerons nos propres recherches.

MATERIEL ET TECHNIQUES

Notre travail a été effectué sur des embryons de Poulet de race Leghorn blanche du 4ème jour d'incubation à l'éclosion, et sur des Poulets de même race âgés de 1 jour à 3 mois.

Les oeufs gardés en chambre froide (1 à 2 jours) séjournent 24 heures à la température ambiante avant d'être incubés en couveuse artificielle à 38°5.

Nous avons réalisé notre travail à l'aide de techniques d'histologie classique en vue de l'étude de l'organogenèse et de l'histogenèse en microscopie optique, en microscopie électronique et à l'aide de techniques histo-chimiques utilisées actuellement, qui nous ont permis d'étudier d'une manière plus approfondie la différenciation des tissus corticosurrénalien et médullo-surrénalien.

Le prélèvement des glandes surrénales ou du territoire où elles apparaissent est effectué le plus rapidement possible. Les surrénales sont fixées in situ puis après dissection, par immersion dans les différents fixateurs appropriés pour les études histologiques et histo-chimiques. Les pièces doivent être de petite taille afin d'obtenir une pénétration rapide des fixateurs.

I - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES CLASSIQUES

A - MICROSCOPIE OPTIQUE

Nous avons utilisé comme fixateurs les liquides de Bouin Hollande, de Bouin Hollande sublimé, de Helly, de Regaud. Les pièces ont été incluses à la paraffine, débitées en coupes sériées de 5 µ, colorées au trichrome de Masson (glycémalum, fuchsine-ponceau, bleu de méthyle ou Fast green).

Nous avons également utilisé le fixateur de WOOD (1963) dont nous exposons la composition et le mode opératoire de coloration ultérieurement. Ce fixateur destiné à l'étude de la médullosurrénale a l'avantage d'être excellent pour nos tissus embryonnaires.

B - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Pour les stades très jeunes (embryons de 4 à 7 jours) l'embryon prélevé est immédiatement plongé dans le glutaraldéhyde à 2,5% dans le tampon Soerensen 0,1M pH 7,2 - 7,3. Le territoire d'apparition des glandes surrénales (région antérieure du mésonephros) est prélevé sous loupe binoculaire, découpé en petits cubes séries de 1mm^3 qui sont fixés dans le glutaraldéhyde puis dans l'acide osmique selon la technique ci-dessous.

Pour les stades âgés, les surrénales sont fixées *in situ* dès l'ouverture de la cavité abdominale de l'embryon par du glutaraldéhyde à 2,5% dans du tampon Soerensen 0,1M pH 7,2 - 7,3 puis les prélèvements sont fixés par immersion dans le même fixateur pendant 1 heure à 4°C.

Après lavage dans le tampon phosphate, les pièces sont placées dans de l'acide osmique à 1% dans le même tampon pendant 1 heure à 4°C. Après deshydratation elles sont incluses en Epon selon la technique de LUFT (1961). La majorité des coupes ultrafines ont été faites sur microtome Servall de Porter - Blum. Quelques blocs ont été coupés sur ultramicrotome Reichert Om U₂. Les coupes sont contrastées à l'acétate d'uranyle à 1% pendant 20 minutes puis au citrate au plomb (REYNOLDS 1963) pendant 20 minutes et sont examinées au microscope Siemens Elmiskop 001.

II - TECHNIQUES HISTOCHIMIQUES

De nombreuses recherches histochimiques ont été effectuées sur coupes au cryostat. Dans ce cas, lors du prélèvement le tissu frais est immédiatement congelé à - 20° au cryostat I.E.C., débité en coupes séries de 16 μ recueillies sur des lamelles qui sont plongées dans les différents colorants ou bains d'incubation selon les techniques.

Ces techniques seront exposées brièvement dans ce chapitre car nous serons amenés à en discuter certains points lors de l'exposé de nos résultats.

A - ETUDE DU TISSU CORTICOSURRENALIEN

Nous avons recherché la nature des lipides présents dans la cortico-surrénale embryonnaire, la mise en évidence d'acide ascorbique, et de la $\Delta^5 - 3\beta$ hydroxystéroïdodeshydrogénase.

1° - MISE EN EVIDENCE DES LIPIDES

a) - Lipides en général. Coupes congélation et coupes cryostat

- Rouge Soudan III et IV en solution alcoolique.
 - Noir Soudan B (MERCK) en solution alcoolique à 70° - 10 minutes. Différenciation 30 secondes dans l'alcool 70° (BAKER 1944)
 - Noir Soudan B en solution dans le propylène glycol coloration 5 minutes. - Différenciation 3 secondes dans le propylène glycol à 85%.
 - Différenciation 3 secondes dans le propylène glycol à 50%.
- (CHIFFELLE et PUTT 1951)

b) - Lipides neutres. Coupes cryostat

- Bleu BZL en solution alcoolique à 60°
 - Oil Red O (E. GURR) (LILLIE 1944) en solution saturée dans l'isopropanol : solution mère.
- Au moment de l'emploi le mélange colorant (6 volumes de la solution mère + 4 volumes d'eau distillée) est filtré après un repos de 10 minutes. Coloration 10 minutes. Différenciation 5 secondes dans l'isopropanol à 60%. Coloration nucléaire à l'hémalum.

La coloration à l'Oil Red O s'altère en quelques semaines, les coupes sont donc photographiées les jours suivants.

Pour vérifier la nature lipidique des inclusions colorées certaines coupes sont plongées dans de l'acétone pendant 30 minutes à la température ambiante.

- Fettrot 7 B. (CIBA) (PEARSE 1960) en solution à 1% dans l'alcool à 70°. Coloration 10 minutes. Différenciation 10 secondes dans l'alcool à 70°

c) - Distinction entre lipides acides et lipides neutres

- Sulfate de bleu de Nil (GIGY) (CAIN 1947) en solution aqueuse à 1% à 60°C. Coloration 10 minutes, lavage rapide à l'eau distillée à 60°C. Différenciation 1 minute dans de l'acide acétique à 1% à 60°C.

- Une coupe voisine de la précédente après coloration dans la solution à 1% est colorée 10 minutes dans une solution de bleu de Nil à 0,02% à 60°C, lavée à l'eau distillée et différenciée 1 minute dans de l'acide acétique.

- Une coupe voisine est colorée au noir Soudan B.

- Une coupe voisine est traitée par la pyridine pure froide pendant 2 heures ou par la pyridine pure à 60°C afin d'extraire les lipides. Après l'avoir amenée à l'eau, on la traite par le noir Soudan B afin de vérifier la nature lipidique des inclusions colorées.

d) - Phospholipides

. "Postchromisation contrôlée" d'ELFTMAN 1954

Les prélèvements sont mis dans le mélange suivant à 56°C pendant 18 heures.

- . Bichromate de potassium 5 g
- . Solution acétate de sodium M/5 (2,7g%) 7 ml
- . Acide acétique M/5 (1,2ml%) 93 ml

Lavage en eau courante pendant 6 heures. Inclusion paraffine.

Coloration des coupes pendant 2 heures à 56°C par la solution :

- . Acide acétique M/5 98,5 ml
- . Solution acétate de sodium M/5 1,5 ml
- . Hématoxyline 0,1 g
- . Ferricyanure de potassium 0,005 g

Lavage à l'eau distillée. Deshydratation. Montage.

Des coupes voisines des précédentes sont colorées par le noir Soudan B.

- . Luxol Fast Blue (E. GURR) (PEARSE 1960)

Fixateur Bouin.

Coloration 20 heures dans une solution à 0,1% dans l'alcool à 95° à (60°C) (KLÜVER et BARRERA 1953).

Différenciation 30 minutes dans du carbonate de lithium à 0,02%.

e) - Cholestérol

- . Réaction à la digitonine de WINDAUS (variante de LISON)

Coupes au cryostat traitées par une solution de digitonine à 0,5%

dans l'alcool à 50° pendant 18 à 24 heures. Après lavage soigneux à l'alcool à 50 puis à l'eau distillée, les coupes sont montées à la glycérine gélatinée puis observées en lumière polarisée afin de rechercher les cristaux du complexe cholestérol-digitonine.

Certaines coupes après passage dans la solution de digitonine sont colorées par le noir Soudan B. Le complexe cholestérol-digitonine ne se colore pas et garde sa biréfringence, tandis que la biréfringence des esters du cholestérol est atténuée ou supprimée.

f) - Plasmalogènes (HAYES 1949)

Coupes au cryostat.

Lavages dans une solution à 0,9% de chlorure de sodium.

Solution aqueuse de chlorure mercurique à 1%, 5 minutes. Certaines coupes qui servent de témoins sont pendant ce temps mises dans une solution de chlorure de sodium à 0,9%.

Réactif de SCHIFF n'ayant pas servi 10 minutes.

Les coupes témoins sont également placées dans du réactif de SCHIFF mais dans un récipient différent.

Lavages dans 3 bains d'eau sulfureuse, puis en eau courante 10 minutes.

Coloration au vert de méthyle 0,5% dans de l'eau acétifiée par de l'acide acétique à 0,5%.

2°- DETECTION DE L'ACIDE ASCORBIQUE

a) - Sur pièces (BACCHUS 1950)

Les prélèvements de tissu frais et de très petite taille sont plongés dans une solution de nitrate d'argent en milieu acide.

- . Nitrate d'argent 10 g
- . Eau distillée 100 ml
- . Acide acétique 1 ml

pendant 1 heure à l'obscurité.

4 lavages de 15 minutes chacun avec une solution de sulfite de sodium à 10%.

2 lavages de 30 minutes chacun avec une solution de thiosulfate de sodium à 10%.

Lavage à l'eau distillée, déshydratation et inclusion à la paraffine.

Après déparaffinage, les coupes sont colorées à la safranine (1g de safranine dans 100 ml d'alcool, après dissolution on ajoute 50 ml d'eau distillée), déshydratées puis montées à l'Eukitt.

b) - Sur coupes au cryostat

Coupes de 30 μ .

Les coupes recueillies sur lamelles sont plongées dans le réactif suivant pendant 30 minutes.

- . Alcool à 96° 9 ml
- . Acide acétique 1 ml
- . Solution aqueuse de NO_3 AG 20% 10 ml

Lavage à l'acide acétique à 5% puis à l'eau distillée et montage des lamelles à la glycérine gélatinée.

3° - DETECTION DE LA $\Delta 5 - 3\beta$ HYDROXYSTEROIDODESHYDROGENASE

a) - Principe

WATTENBERG (1958) a appliqué à la $\Delta 5 - 3\beta$ HSDH le principe de mise en évidence de la NAD diaphorase par la réduction d'un sel de tétrazolium (FARBER, STERNBERG et DUNLAP 1956).

La $\Delta 5 - 3\beta$ HSDH permet le transfert d'atomes d'hydrogène d'un substrat (ex : DHA (déhydroépiandrostérone)) sur un coenzyme le NAD (nicotinamide adénine-dinucléotide) qui est transformé en NADH_2 , le substrat est alors oxydé (androsténone). Cette réaction est couplée avec la réduction d'un sel de tétrazolium. Le NADH_2 formé réduit le sel de tétrazolium au moyen de la diaphorase en un précipité de formazan. Ce précipité localise histologiquement la réaction enzymatique. Il n'est pas spécifique uniquement de la $\Delta 5 - 3\beta$ HSDH. Pour que ce précipité se forme il faut que le tissu possède à la fois la diaphorase et la $\Delta 5 - 3\beta$ HSDH.

b) - Détection

La présence de la $\Delta 5 - 3\beta$ HSDH a été recherchée suivant la technique de

LEVY, DEANE et RUBIN (1959) légèrement modifiée.

Nous recherchons cette activité enzymatique sur du tissu frais coupé au cryostat.

Nous avons supprimé le lavage préalable au liquide de Krebs. Les coupes musculaires sur lames sont plongées dans du formol calcium neutre glacé, ou du formol calcium saccharose. (5% de saccharose) Elles sont ensuite rincées dans un tampon glacé 0,1M pH 7,1 (COLLENOT et OZON 1965) puis incubées à 38°C pendant 1 heure dans le milieu suivant :

Substrat	: Déhydroépiandrostérone (FLUKA) /.....	4mg
Solvant du substrat ..	: Diméthylformamide (FLUKA)	10ml
	Solution de Nitro-Blue-Tétrazolium à 1mg/ml	20ml
	Solution de Nicotinamide (FLUKA) à 1,6mg/ml	14ml
Coenzyme	: Solution de N.A.D. (FLUKA) 3mg/ml	16ml
	Tampon phosphate 0,1M pH 7,1	80ml

La diméthylformamide déjà utilisée par de nombreux auteurs remplace le propylène glycol de la technique de LEVY DEANE et RUBIN 1959, qui provoquait sur leurs lames témoins une réaction parasite (mise en évidence d'une alcool déshydrogénase).

Des lames témoins sont incubées dans le même milieu mais ne contenant pas de substrat c'est à dire de déhydroépiandrostérone.

Après l'incubation les coupes sont rincées dans le tampon, colorées au vert de méthyle et montées à la glycérine gélatinée.

Elles sont observées et photographiées au cours des heures suivantes.

TECHNIQUES HISTOCHIMIQUES APPLIQUEES AU TISSU CORTICOSURRENALIEN

AUTEURS	METHODES EMPLOYEES	CONDITIONS TECHNIQUES	BUT
BAKER 1944 cité par PEARSE 1960	Noir Soudan B (MERCK)	Coupes congélation. Coupes cryostat Solution alcoolique à 70° : 10" Différenciation 10" dans alcool 70°	Lipides en général
CHIFFELLE et PUTT 1951 cité par PEARSE 1960	Noir Soudan B (MERCK)	En solution dans du propylène glycol Coloration 5" Différenciation 3" propylène glycol à 85 % Diff. 3" propylène glycol à 50 %	Lipides en général
cité par GABE 1968	Bleu BZL	Solution alcoolique à 60°	Lipides neutres
LILLIE 1944 cité par GABE 1968	Oil Red O (E. GURR)	Coupes cryostat Solution dans isopropanol Coloration 10" Différenciation 10" dans isopropanol à 60 %	Lipides neutres
PEARSE 1960	Fettrot 7 B (CIBA)	Solution 1 % dans alcool 70° Coloration 10" Différenciation 10" dans alcool 70°	Lipides neutres
CAIN 1947 cité par GABE 1968	Sulfate de Bleu de Nil (GEIGY)	Solution aqueuse 1 % à 60°C 10" Différenciation 1" dans acide acétique à 1 % à 60°C	Distinction entre Lipides acides et Lipides neutres

AUTEURS	METHODES EMPLOYEES	CONDITIONS TECHNIQUES	BUT
WINDAUS (variante de LISON) cité par GABE 1968	Digitonine (FLUKA)	Solution à 0,5% dans alcool à 50° Coloration 18 à 24 heures Examen en lumière polarisée	Cholestérol
HAYES 1949 cité par GABE 1968	Réaction plasmale	Coupes cryostat Lavage solution chlorure de sodium Chlorure mercurique à 1% 5 minutes Réactif de Schiff 10 minutes Eau sulfureuse	Plasmalogènes
ELFTMAN 1954 cité par GABE 1968	Postchromisation contrôlée	Fixation 18 heures à 56°C Inclusion paraffine Coloration 2 heures à 56°C	Phospholipides
" KLUVER et BARRERA 1953 cité par PEARSE 1960	Luxol Fast Blue (E. GURR)	Coloration 20h dans une solution à 0,1 % dans alcool à 95° à 60°C Différenciation 30' dans du carbonate de lithium 0,02 %	Phospholipides
cité par GABE 1968	Nitrate d'argent milieu acide	Coupes cryostat Incubation 30' Lavage acide acétique à 5 %	Acide ascorbique
BACCHUS 1950 cité par PEARSE 1960	Nitrate d'argent milieu acide	Sur pièces. Incubation 1h à l'obscurité. Sulfite de sodium à 10% 1heure Hypo-sulfite de sodium à 10 % 1heure Inclusion paraffine Coloration des coupes safranine	Acide ascorbique

B - ETUDE DU TISSU MEDULLOSURRENALIEN

Les catécholamines possèdent des propriétés réductrices qui sont à la base des réactions histochimiques de la médullosurrénale.

Etant donné qu'il n'existe aucune technique permettant la mise en évidence de l'adrénaline seule, nous avons recherché d'une part la mise en évidence des catécholamines totales (adrénaline + noradrénaline) et d'autre part celle de la noradrénaline.

1° - MISE EN EVIDENCE DES CATECHOLAMINES TOTALES

a) - Fixateur de HELLY 8 heures suivi de bichromate de potassium 3% pendant 15 heures.

Fixateur de HELLY (ZENKER formol)

ZENKER	. Chlorure mercurique	50g
	. Sulfate de sodium	10g
	. Bichromate de potassium	25g
	. Eau distillée ... q.s.p.....	1l

Au moment de l'emploi on mélange 9 volumes de la solution de ZENKER à 1 volume de formol du commerce neutralisé (à 40 volumes).

b) - Mélange bichromate - chromate (HILLARP et HÖKFELT 1955)

Les pièces sont plongées dès le prélèvement pendant 24 heures dans le mélange préparé extemporanément.

. Bichromate de potassium à 5%	10 volumes
. Chromate de potassium à 5%	1 volume

puis dans du formol 10% pendant 24 heures.

2° - MISE EN EVIDENCE DE LA NORADRENALINE

a) - Iodate de potassium (HILLARP et HÖKFELT 1953)

Iodate de potassium à saturation (10%) pendant 24 heures suivi de formol à 10%.

Les pièces ainsi fixées par ces différents mélanges (HELLY ou bichromate - chromate ou iodate de potassium) en vue de la réaction phéochrome sont rapidement déshydratées et incluses à la paraffine (déshydratation et inclusion en 5 heures). Les pièces sont coupées à 10 μ , déparaffinées et montées sans coloration.

- Par le mélange bichromate - chromate l'ensemble des catécholamines est oxydé en un pigment jaune-brun.

- Par l'iodate de potassium, la noradrénaline seule donne une coloration jaune clair.

Pour une meilleure visualisation de l'organisation de la glande, certaines coupes ont eu une légère coloration de fond au bleu de toluidine à 0,2%. Après une différenciation de courte durée dans de l'eau acétifiée à 1% les coupes sont déshydratées et montées à l'Eukitt. Les cellules médullosurrénaliennes apparaissent alors colorées en bleu-vert.

b) - Technique de TRAMEZZANI, CHIOCCIO et WASSERMAN (1964)

Après fixation au glutaraldéhyde, réduction de sels d'argent en milieu alcalin.

Les prélèvements de 1mm³ sont fixés dans du glutaraldéhyde à 6,5% dans du tampon phosphate Soerensen 0,1M pH 7,2 - 7,3 à 4°C pendant 6 heures. Après un lavage soigneux dans de l'eau distillée plusieurs fois renouvelée, les pièces sont plongées dans un complexe ammoniacal d'argent préparé au moment de l'emploi, pendant des temps variables de 3 à 20 minutes suivant le stade embryonnaire. Après un nouveau lavage à l'eau distillée, passage dans l'hypo-sulfite de sodium à 1% pendant 10 minutes puis dans l'eau distillée 10 minutes, les pièces sont déshydratées et incluses en Epon.

L'observation de coupes semi-fines permet de repérer les cellules qui renferment de la noradrénaline car celles-ci sont très nettement marquées

par un précipité noir d'argent.

Les pièces ainsi incluses en Epon sont également destinées à l'observation en microscopie électronique. A l'échelle ultrastructurale certains granules des cellules médullosurréaliennes sont recouverts d'un précipité noir d'argent plus ou moins fin et plus ou moins dense.

Nous avons également appliqué cette technique à du matériel coupé à 16μ au cryostat à -20°C . Les coupes recueillies sur lamelles sont traitées suivant la technique exposée ci-dessus, déshydratées et montées à l'Eukitt en vue de l'observation en microscopie optique.

c) - Complexe ferro-ferricyanure (HOPSU et MÄKINEN 1966)

Cette méthode est basée sur la réduction de Fe^{+++} en Fe^{++} qui est capturé avec un anion ferricyanure pour former un complexe ferro-ferricyanure bleu insoluble.

Les coupes qui proviennent de matériel fixé au glutaraldéhyde 6,5% dans du tampon phosphate pH 7, et inclus à la paraffine, sont incubées pendant 15 minutes dans un milieu contenant 8 mg/ml de chlorure ferrique et 2 mg/ml de ferricyanure de sodium dans du tampon cacodylate 0,1M à pH 5.

Seules les cellules contenant de la noradrénaline sont intensément colorées en bleu.

d) - Réduction d'un sel de Tétrazolium à pH alcalin
(HOPSU et MÄKINEN 1966)

Les pièces sont fixées au glutaraldéhyde 6,5% dans du tampon phosphate pH 7, pendant 24 heures. Les coupes sont incubées pendant 10 à 30 minutes dans un milieu contenant du Nitro BT (0,5 mg/ml en solution dans un tampon Michaelis 0,2M pH 11,0. Après incubation les coupes sont montées à la glycérine gélatinée.

Les cellules contenant de la noradrénaline sont colorées en bleu par un dépôt de formazan.

Selon HOPSO et MAKINEN la noradrénaline formerait un produit de condensation avec le glutaraldéhyde, ce produit qui est insoluble est capable de réduire le Fe^{+++} en Fe^{++} et le sel de tétrazolum en formazan.

Les composés formés avec d'autres aldéhydes (formaldéhyde, acétaldéhyde, benzaldéhyde ou naptaldéhyde) sont solubles et sont donc éliminés des coupes lors des lavages.

L'adrénaline forme aussi des composés avec le glutaraldéhyde mais ceux-ci sont solubles et sont éliminés des tissus pendant la fixation et l'incubation.

e) - Technique de WOOD 1963

Le fixateur consiste en un mélange formol-bichromate : solution à 2,5% de bichromate de potassium et 1% de sulfate de sodium anhydre dans un tampon M/5 acétate à pH 4,1. Au moment de l'emploi on ajoute une partie de formaldéhyde à 10% pour 10 parties de la solution précédente. Le pH du fixateur est ajusté à 4,0 - 4,2.

La fixation d'une durée de 24 heures est suivie d'un rinçage pendant une nuit en eau courante.

Après déshydratation et inclusion à la paraffine, les pièces sont coupées à 5 μ .

Les coupes déparaffinées, hydratées sont colorées pendant 15 minutes dans la solution comprenant :

- 1 partie d'éosine jaunâtre à 1% en solution aqueuse.
- 1 partie de bleu d'aniline à 0,5%.
- 1 partie de tampon acétate M/5 pH 4.

Le pH de la solution colorante est ajusté à 4,0.

Après coloration, les coupes sont différenciées dans de l'alcool à 95°, déshydratées, éclaircies au toluène et montées à l'Eukitt.

Certaines coupes au lieu d'être colorées par le mélange éosine jaunâtre-bleu d'aniline, sont colorées par du Giemsa dilué (1 goutte pour 1ml d'eau distillée) pendant 6 heures. Après rinçage soigneux en eau distillée et différenciation rapide dans de l'alcool à 90°, les coupes sont déshydratées et montées à l'Eukitt.

f) - Fixation au glutaraldéhyde. Réduction de bichromate
(WOOD et BARNETT 1964)

Fixation dans du glutaraldéhyde 6,25% dans du tampon cacodylate 0,1M pH 7,4 à 4°C pendant 2 heures.

Après fixation, les pièces sont rincées dans du tampon cacodylate 0,1M pH 7,4 et incubées dans du bichromate de potassium à 2,5% dans du tampon acétate 0,2M pH 4,1 contenant 1% de sulfate de sodium pendant 24 heures à 4°C.

Après incubation les pièces sont coupées à 20 μ au microtome à congélation, montées à la glycérine gélatinée.

g) - Fixation au glutaraldéhyde. Réduction d'acide osmique
(COUPLAND 1964)

Fixation à 4°C dans du glutaraldéhyde 5 - 6% tamponné à pH 7,3 avec un tampon 0,1M cacodylate ou phosphate pendant 2 heures. Lavage dans du tampon froid. Le matériel est post-fixé dans de l'acide osmique 1% tamponné à pH 7,3 pendant 1 heure.

Le principe de cette technique est appliqué comme processus de fixation en microscopie électronique.

Pour la microscopie ~~optique~~ les coupes sont déshydratées et incluses à la paraffine, ou coupées à la congélation et montées à la glycérine.

Les cellules stockant la noradrénaline sont brun sombre tandis que les éléments stockant l'adrénaline sont incolores.

h) - Réaction de fluorescence (ERANKÖ 1952)

Fixation au formol-calcium de BAKER (formol 10% neutralisé et additionné de chlorure de calcium à 1%) pendant 24 heures.

Les coupes à la congélation sont montées au glycérol et examinées en lumière ultra-violette.

Les cellules contenant de la noradrénaline ont une fluorescence verte en lumière U.V.

i) - Réaction de fluorescence aux vapeurs de formaldéhyde
(FALCK, HILLARP, THIEME et TORP 1962, HAMBERGER et
Coll. 1964, SPRIGGS et Coll. 1966)

Les pièces congelées à -20°C sont coupées au cryostat à $16\ \mu$. Les coupes sont recueillies sur des lamelles qui sont rapidement placées dans un dessiccateur à anhydride phosphorique (P_2O_5) pendant 3 heures. Les lamelles sont placées dans un récipient en Pyrex fermant hermétiquement et contenant de la paraformaldéhyde d'humidité relative de 80%. Ce récipient est ensuite placé dans une étuve à 80°C . Les coupes sont alors soumises aux vapeurs de formaldéhyde libérées par la paraformaldéhyde pendant 1 heure à 80°C . (FALCK, HILLARP, THIEME et TORP 1962) Après montage au glycérol les coupes sont examinées en lumière ultraviolette.

Préparation de la paraformaldéhyde d'humidité relative de 80%

La paraformaldéhyde (MERCK) est tout d'abord déshydratée par de l'anhydride phosphorique (P_2O_5) pendant une dizaine de jours au minimum. Cette paraformaldéhyde est ensuite placée à la température ambiante dans un bocal au fond duquel on met un récipient contenant une solution aqueuse d'acide sulfurique : acide sulfurique concentré 341g/l, pour cette concentration la solution d'acide sulfurique a une densité de 1,20 et une humidité relative de 80%. La paraformaldéhyde est alors réhydratée jusqu'à atteindre un taux d'équilibre constant. Elle est utilisable au bout d'une dizaine de jours.

TECHNIQUES HISTOCHIMIQUES APPLIQUEES AU TISSU MEDULLA SURRENALIEN

AUTEURS	METHODS EMPLOYEES	CONDITIONS TECHNIQUES	BUT
HILLARP et "HOKFELT 1955	mélange bichromate - chromate	24 heures suivi de formol-calcium de Baker 24h	adrénaline + noradrénaline
" HILLARP et HOKFELT 1953 modifiée par ERANKÓ 1955	Iodate de potassium	24 heures suivi de formol à 10% 24 heures	noradrénaline
TRAMEZZANI, CHIOCCHIO et WASSERMANN 1964	fixation glutaraldéhyde complexe ammoniacal d'argent	Inclusion en Epon observation de coupes semifines	noradrénaline
HOPUSU et MAKINEN 1966	fixation glutaraldéhyde Incubation dans le milieu contenant du Nitro BT	Incubation 10 à 30 minutes	noradrénaline
" HOPUSU et MAKINEN 1966	Fixation glutaraldéhyde Incubation dans le complexe ferro-ferricyanure	Incubation 15 minutes	noradrénaline

AUTEURS	METHODES EMPLOYEES	CONDITIONS TECHNIQUES	BUT
WOOD 1963	Fixation formol-bichromate pH 4,0 - 4,2 Coloration éosine jaunâtre-bleu d'aniline ou coloration Giemsa dilué	24 heures Rinçage 15 heures en eau courante Coloration 15 minutes Coloration 6 heures	noradrénaline
WOOD et BARNETT 1964	Fixation glutaraldéhyde Incubation bichromate de potassium pH 4,1	Fixation 2 heures Incubation 24 heures	noradrénaline
COUPLAND 1964	Fixation glutaraldéhyde Acide osmique	Fixation 2 heures Acide osmique 1 heure	noradrénaline
" ERANKO 1952	Fluorescence Fixation formol calcium	Fixation 24 heures Observation lumière U.V.	noradrénaline
FALCK et Coll. 1962 HAMBERGER et Coll. 1964	Fluorescence Coupes cryostat Vapeurs de formaldéhyde	Paraformaldéhyde - humidité 80 % Vapeurs formaldéhyde 1 heure à 80°C	noradrénaline

ORGANOGENESE

I - SITUATION. MORPHOLOGIE DE LA GLANDE ADULTE

Les glandes surrénales de Poulet sont des organes bilatéraux situés dorsalement par rapport aux gonades, à l'extrémité antérieure du métanephros près de la veine cave postérieure et de l'aorte. Chez la Poule adulte ces glandes mesurent environ 15 mm de long, 8 mm de large et 5 mm d'épaisseur (MULLER 1929). Leur couleur jaune est due à la présence de nombreux lipides. Leur forme est variable, mais le plus souvent la surrénale droite est de forme pyramidale à pointe caudale, elle est généralement plus petite que la surrénale gauche de forme ovale (HAYS 1914). Chez la Poule la surrénale gauche est complètement recouverte par l'ovaire.

Chaque glande est entourée par une capsule de tissu conjonctif fibro-élastique bien vascularisée. Cette capsule est presque entièrement entourée en périphérie par une gaine riche en gros troncs nerveux.

La glande est constituée fondamentalement par deux constituants : le tissu cortical et le tissu médullaire. Le tissu cortical est formé de cordons cellulaires entre lesquels se trouve le tissu médullaire composé de travées de cellules ou de petits ilots.

II - INNERVATION

L'innervation est bien développée. GIACOMINI (1898) avait noté que la "capsule" surrénale des Oiseaux était richement innervée. KNOUFF et HARTMAN (1951) rapportent que la gaine péricapsulaire du Pélican brun contient de nombreux ganglions et "processus" nerveux; observation étendue à plusieurs autres Oiseaux par ABRAHAM et STAMMER (1959)

L'innervation de la glande surrénale de la Poule a été étudiée par FREEDMAN (1968) à l'aide de perfusion de latex coloré dans le système circulatoire. Les surrénales sont innervées par des nerfs splanchniques partant du 5ème ganglion thoracique jusqu'au 2ème ganglion lombosacré. On trouve occasionnellement des fibres en provenance du 4ème ganglion thoracique et du 3ème ganglion lombosacré. Une branche provenant du plexus coeliaque innerve le bord cranial de la glande.

Un réseau entourant la capsule est composé de fibres nerveuses, de cellules ganglionnaires et de cellules chromaffines (ou médullaires).

La glande est richement innervée, des nerfs pénètrent en grand nombre

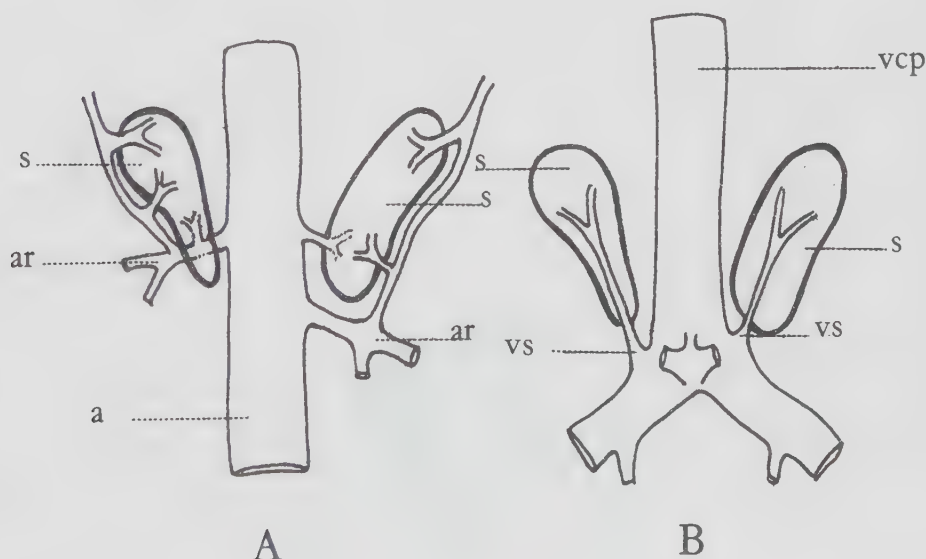
dans la capsule sous forme de petits troncs de fibres nerveuses généralement non myélinisées. Des fibres se détachent de ces troncs et pénètrent par les travées de cellules médullaires. Plusieurs petites branches se subdivisent et entourent les cordons de cellules corticales. Des cellules ganglionnaires isolées ou groupées sont également présentes au milieu des cordons médullaires.

III - VASCULARISATION

Les glandes surrénales chez la Poule s'étendant près de la veine cave postérieure et de l'aorte, les artères et les veines surrénaliennes sont courtes. Le sang artériel peut arriver dans la glande gauche directement de l'aorte dorsale ou par des ramifications antérieures ou postérieures d'une branche de l'artère rénale qui longe latéralement la glande.

La glande droite n'est pas en relation directe avec l'aorte. Le sang artériel arrive d'une branche à l'artère rénale droite (HAYS 1914).

Une courte veine surrénalienne draine le sang veineux de chaque glande dans la veine cave postérieure.



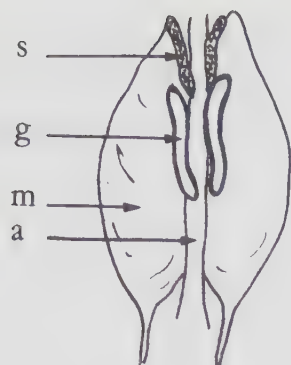
VASCULARISATION DES GLANDES SURRENALES DE LA POULE. (d'après HAYS 1914)

A - Système artériel : aspect ventral

a : aorte; ar : artère rénale; s : surrénale

B - Système veineux : aspect ventral

VCP : veine cave postérieure; VS : veine surrénalienne



7 jours



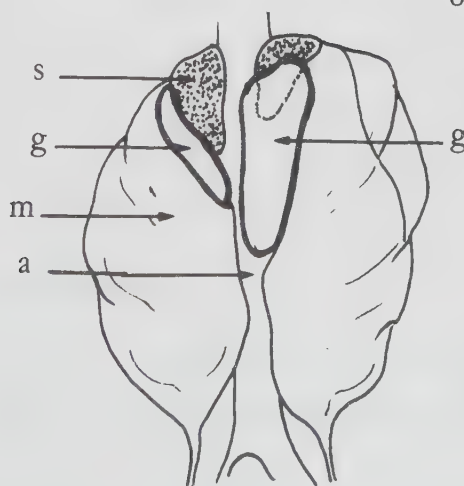
♂ 9 jours



♂ 14 jours



♂ 16 jours



♀ 16 jours

MORPHOGENESE DES GLANDES SURRENALES CHEZ L'EMBRYON DE POULET
a : aorte; g : gonade; m : mésonephros; s : glande surrénale.

IV - ORGANOGENESE

Elle a été étudiée par de nombreux auteurs que nous avons déjà cités dans le chapitre Historique et SIVARAM (1965) a publié une synthèse de ces résultats qu'il a complétée par une étude des volumes relatifs des constituants de la glande.

La surrénale a une double origine : l'ébauche corticale provient de l'épithélium coelomique; l'ébauche médullaire est d'origine neurectoblastique, et résulte de la migration de cellules sympathiques vers l'ébauche corticale.

a) - Tissu cortical

L'organogenèse de la surrénale débute par le développement du tissu cortical.

Au 4ème jour de l'incubation, les ébauches corticales apparaissent sous forme d'un épaississement de l'épithélium péritonéal situé dorsalement par rapport à la crête génitale et ventralement par rapport au mésonephros (Planche I Figure 1). Les premiers groupes de cellules migrent dorsalement, s'agrandissent et s'arrondissent. Ces cellules diffèrent des cellules péritonéales par leur plus grande taille et leur noyau moins colorable.

Au 5ème jour, les ébauches corticales forment des masses bien compactes dans le mésenchyme de chaque côté de l'aorte, contre la face ventromédiane du mésonephros (Planche I Figure 2).

Au 6ème jour, des cellules mésenchymateuses séparent les ébauches corticales du mésonephros (Planche I Figure 3). Dans ces ébauches les cellules se divisent, prennent une forme hexagonale et s'organisent en cordons.

Au 8ème jour de l'incubation, les cordons sont nettement développés (Planche I Figure 4) et la présence de petits capillaires sanguins indique le début de la vascularisation. Du tissu conjonctif se développe autour des ébauches corticales et les isole au 9ème jour d'incubation.

b) - Tissu médullaire

Le tissu médullaire ou chromaffine provient de cellules sympathiques migrant des crêtes neurales. Les cellules sympathiques ont une double destinée :

- ou bien elles donnent naissance à des cellules nerveuses qui se

PLANCHE I

PLANCHE I

Figure 1 : Embryon 4 jours d'incubation. Fixation Wood coloration éosine jaunâtre.

On note un épaissement de l'épithélium coelomique (—→) à partir duquel se différencient les cellules corticales. Certains îlots de ces cellules sont déjà individualisés (Ec).

Ec : Ebauche corticale ; M : mésonephros. (x 160)

Figure 2 : Embryon 5 jours d'incubation. Fixation Wood coloration éosine jaunâtre.

Ebauche corticale se développant contre la face interne du mésonephros dont on observe les éléments.

A : aorte ; Ec : Ebauche corticale ; M : mésonephros. (x 160)

Figure 3 : Embryon 6 jours d'incubation. Fixation Wood coloration éosine jaunâtre.

Les cellules migratrices (—→) se déplaçant dans le mésenchyme arrivent au contact des îlots corticaux et commencent à s'infiltrer entre eux.

Ec : Ebauche corticale ; Cm : cellules migratrices ; M : mésonephros. (x 160)

Figure 4 : Embryon 8 jours d'incubation. Fixation Wood coloration Giemsa dilué.

Les cordons corticaux sont bien développés. Des cellules migratrices issues des crêtes neurales se différencient en cellules nerveuses. Début de la vascularisation.

CC : cordon cortical ; CM : cellules médullaires ; Cn : cellules nerveuses ; Co : tissu conjonctif. (x 160)

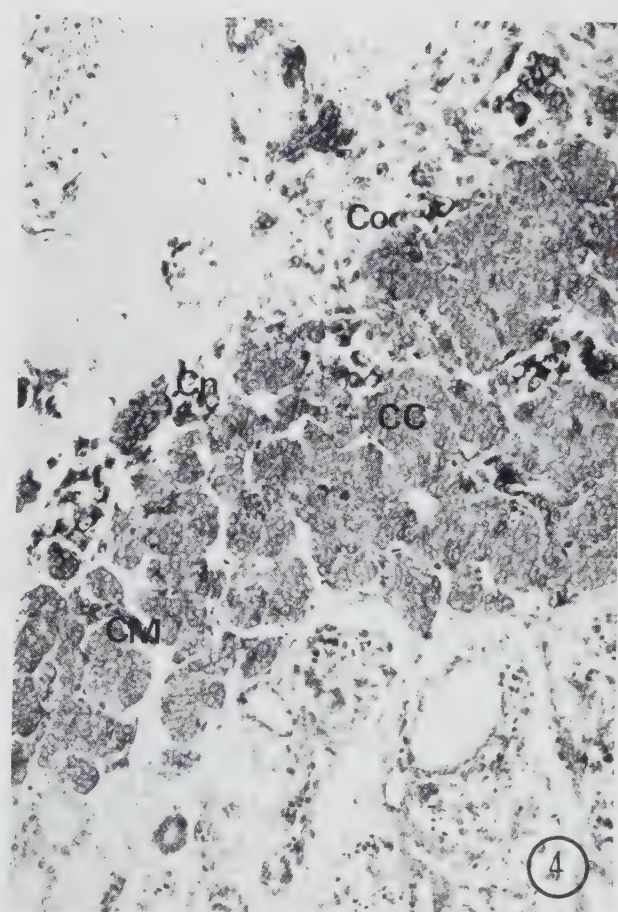
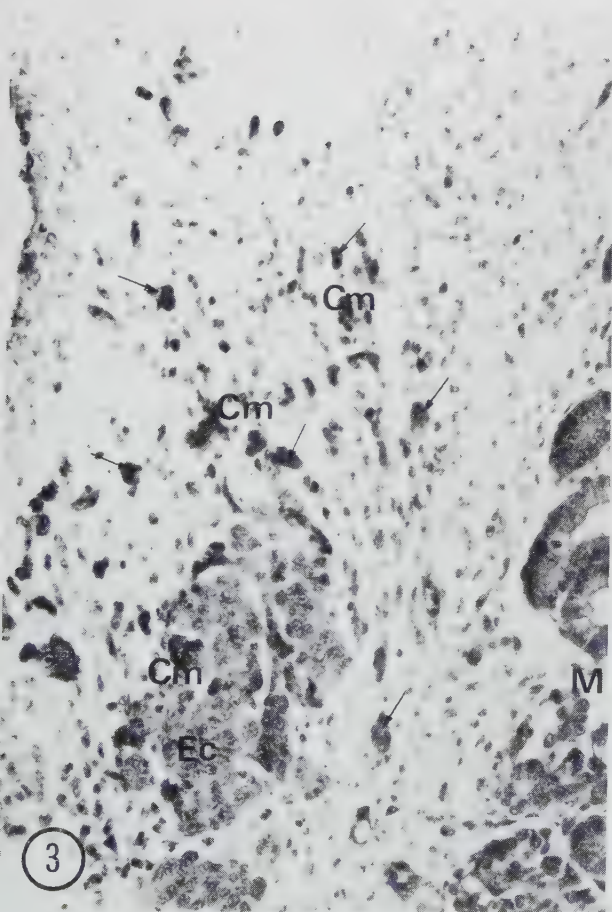
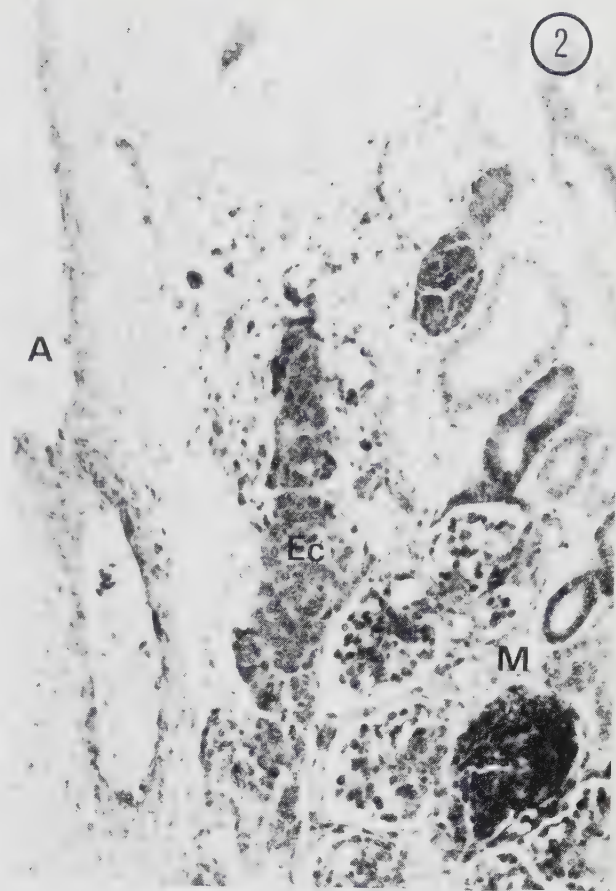
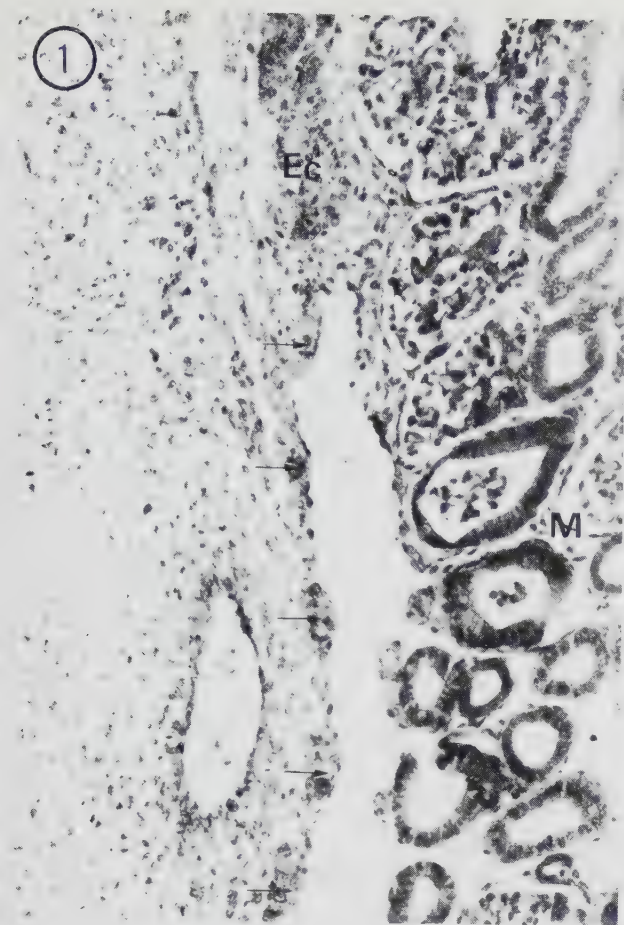


PLANCHE II

PLANCHE II

Figure 5 : Embryon 6 jours d'incubation. Fixation Wood coloration éosine jaunâtre.

Cellules sympathiques migrant le long des parois de l'aorte.

A : aorte ; Cm : cellules migratrices. (x 160)

Figure 6 : Embryon 6 jours d'incubation. Fixation Wood coloration éosine jaunâtre.

Cellules sympathiques se déplaçant le long des parois de l'aorte et se dirigeant vers les ébauches corticales.

A : aorte ; Cm : cellules migratrices. (x 160)

Figure 7 : Embryon 12 jours d'incubation. Réaction de TRAMEZZANI, CHIOCCHIO et WASSERMAN sur pièces. Coupe semi-fine. Coloration de fond bleu de toluidine.

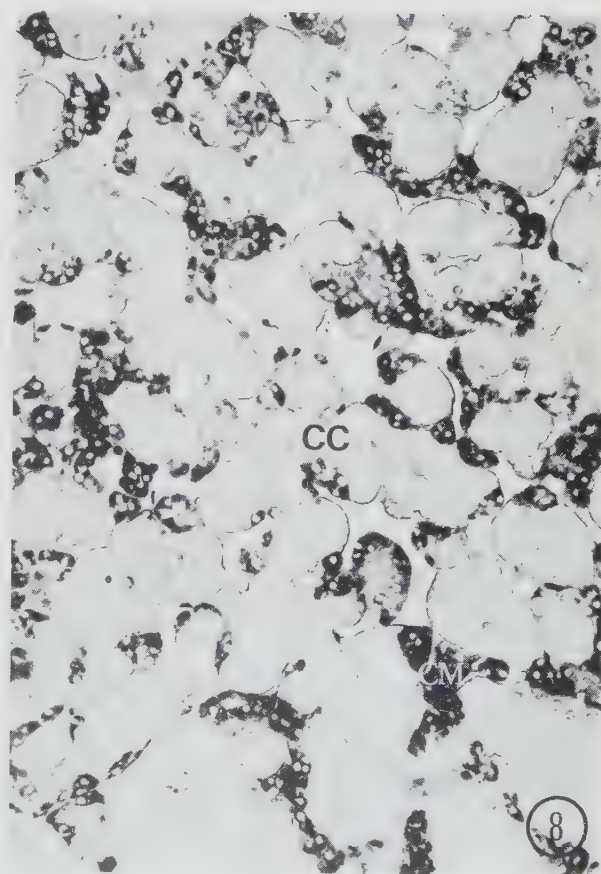
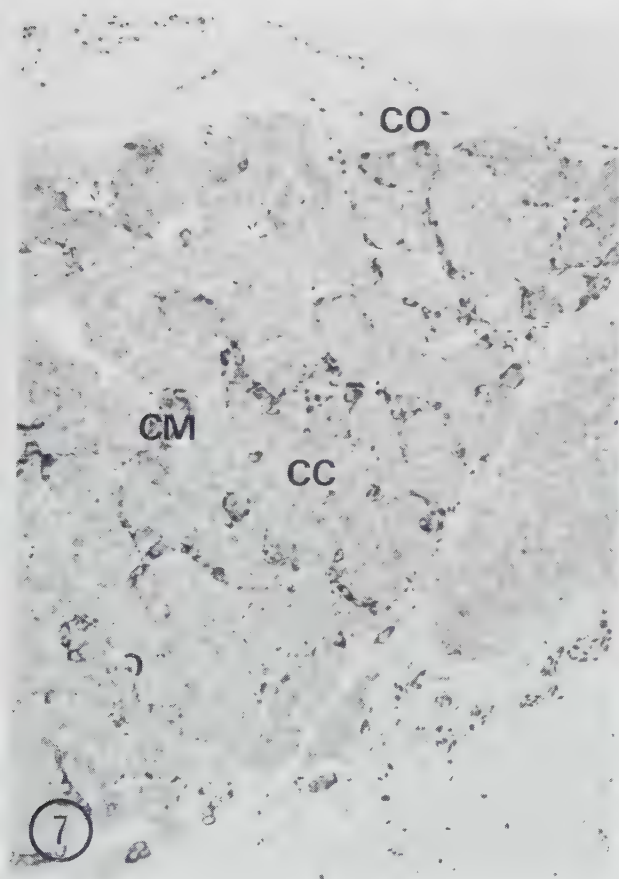
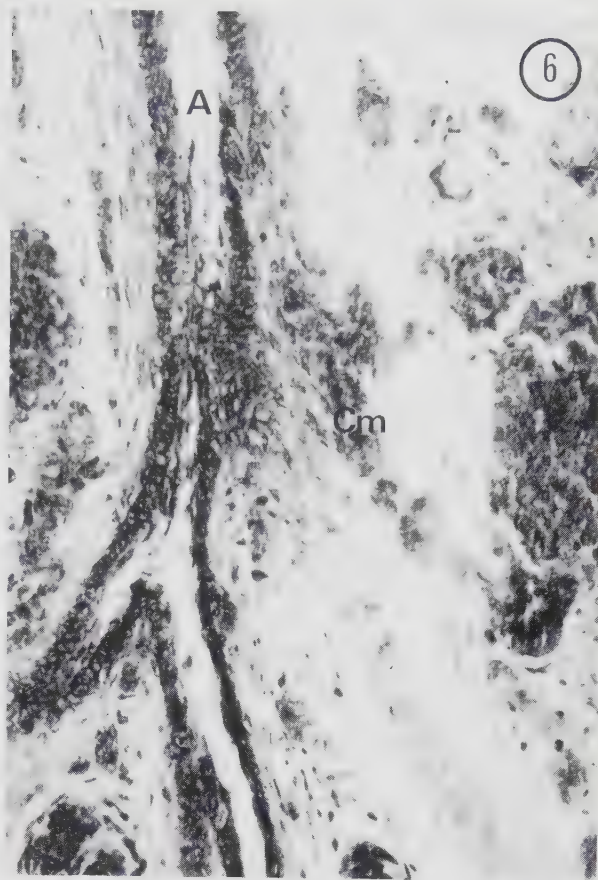
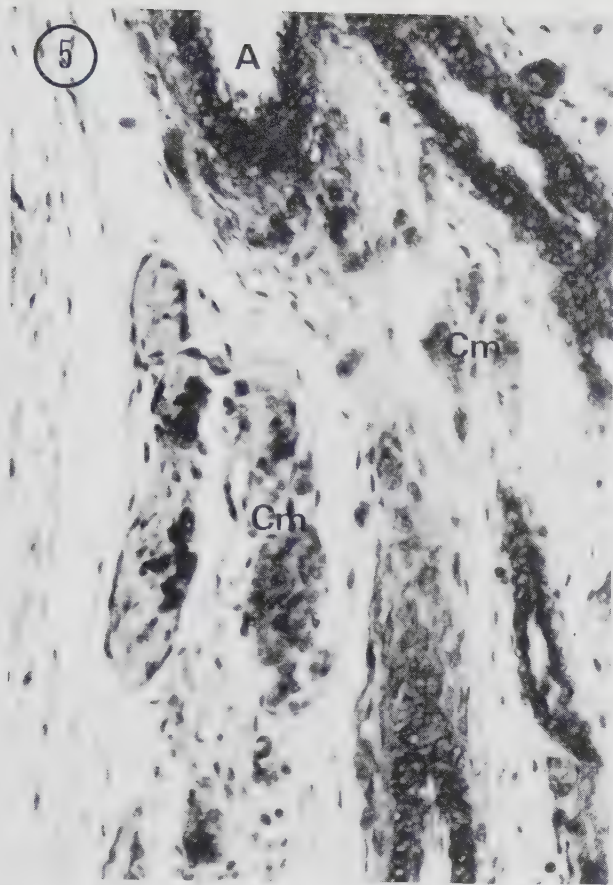
Les cellules médullaires qui ont pénétré en files entre les cordons corticaux se regroupent en petits îlots.

CC : cordon cortical ; CM : cellules médullaires ; CO : tissu conjonctif. (x 100)

Figure 8 : Embryon 19 jours d'incubation. Réaction de TRAMEZZANI sur pièces. Coupe semi-fine. Coloration de fond bleu de toluidine.

Organisation de la glande en fin d'incubation. Les cellules corticales sont facilement distinctes des cellules médullaires au niveau desquelles on observe un précipité d'argent plus ou moins dense.

CC : cordon cortical ; CM : cellules médullaires. (x 160)



regroupent pour constituer des ganglions sympathiques.

- ou bien elles perdent leurs caractères morphologiques de cellules nerveuses, acquièrent ceux de cellules glandulaires.

Elles migrent ventralement de chaque côté de l'aorte au cours des 4ème et 5ème jours (Planche II Figures 5 - 6), arrivent au voisinage des ébauches corticales sur leurs faces dorsales et médianes.

Au 6ème jour d'incubation les cellules médullaires sont au contact des masses corticales et commencent à s'infiltrer entre les cordons corticaux. (Planche I Figure 3)

Au 7ème jour les cellules médullaires pénètrent dans toutes les directions et se rassemblent en petits groupes de 2 ou 3 cellules, formant des files irrégulières au 8ème jour. (Planche I Figure 4) Quelques cellules migratrices se différencient en cellules nerveuses. Un réseau de fibres nerveuses relie les cellules médullaires aux troncs sympathiques extérieurs.

Au 9ème jour les cordons corticaux sont complètement envahis par les travées de cellules médullaires. A ce stade, la capsule conjonctive est bien formée.

Au cours des jours suivants les cellules se multiplient (Planche II Figure 7), la vascularisation se développe. Des artérioles donnent des capillaires qui envahissent toute l'ébauche, un réseau de sinusoïdes est bien développé. Tous les éléments sont en place et l'organogenèse est presque terminée. Dans les derniers jours de l'incubation la structure de la glande est celle de la glande adulte (Planche II Figure 8).

V - VOLUMES RELATIFS DES CONSTITUANTS CORTICAL ET MEDULLAIRE

SIVARAM (1965) a analysé quantitativement les volumes relatifs des éléments cortical et médullaire de la glande surrénale embryonnaire et adulte du Poulet.

Pendant les stades embryonnaires et chez les jeunes Poulets, le tissu cortical est le principal constituant de la glande. Au cours du développement embryonnaire le volume relatif du tissu cortical occupe près de la moitié du volume de la glande surrénale, il croît jusqu'à en occuper les trois cinquièmes au moment de l'éclosion puis il décroît et chez l'adulte n'occupe que les deux cinquièmes du volume de la glande.

Le pourcentage de volume du tissu médullaire est bien inférieur à celui du tissu cortical, au cours de la vie embryonnaire il n'occupe en effet que le quart du volume de la glande, et le volume relatif le plus bas est observé à l'éclosion. Après l'éclosion il augmente très rapidement et chez l'adulte il est toujours supérieur à celui du cortex, il occupe alors près de la moitié du volume total de la glande.

Le volume relatif des vaisseaux diminue légèrement des stades embryonnaires aux stades adultes.

RELATIVE VOLUMES

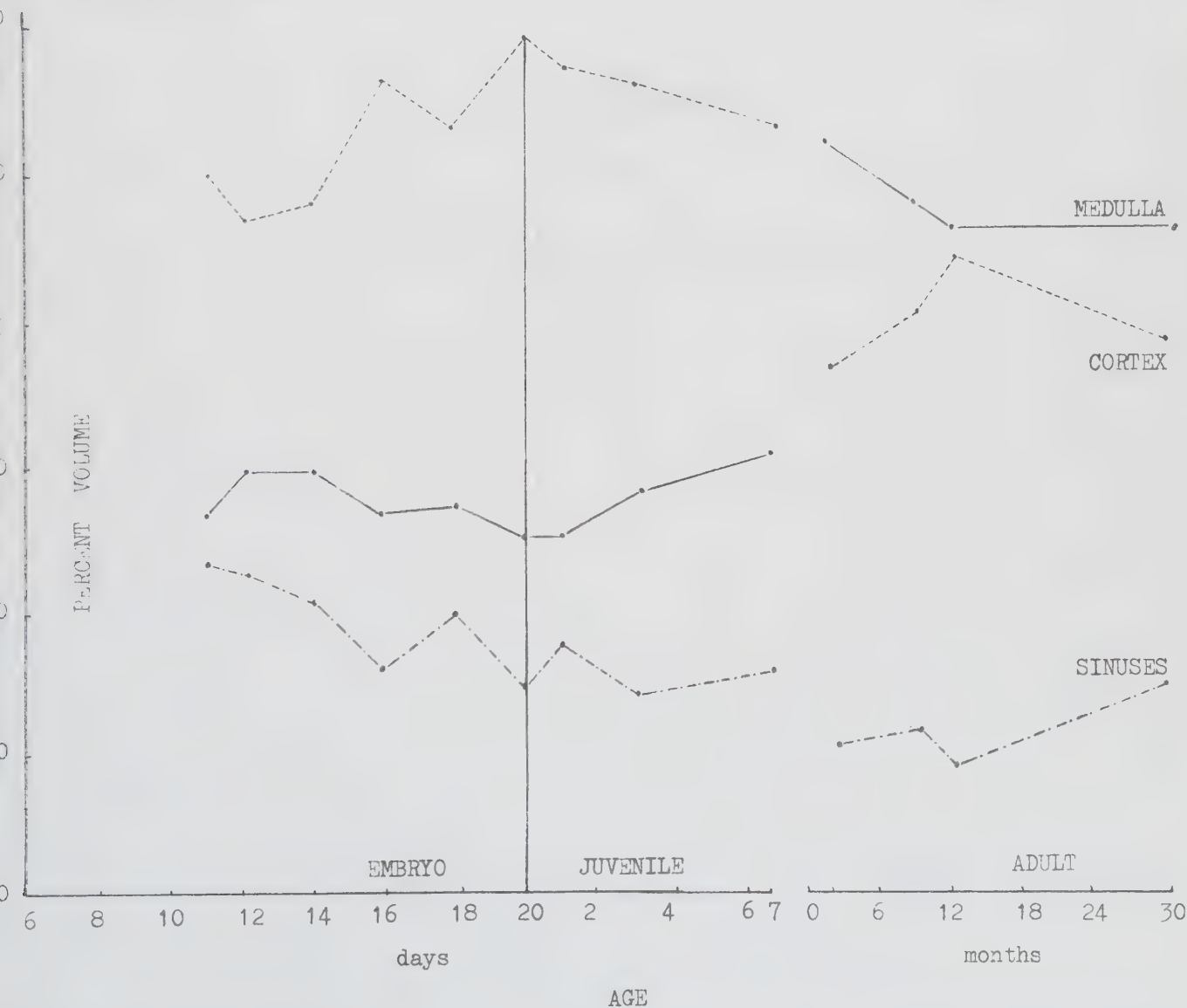


Schéma des volumes relatifs des constituants corticaux, médullaires et des vaisseaux dans la surrénale du Poulet, à des stades variés du développement, basés sur les rapports de CHALKEY (Publication de SIVARAM 1965)

HISTOGENESE
DES
CELLULES CORTICALES

I - CARACTERES MORPHOLOGIQUES

A) - INTRODUCTION

Au cours de l'étude des caractères ultrastructuraux des cellules corticales qui nous permettra de suivre la mise en place des organites, leur évolution et le début de la fonction stéroïdogène de la surrénale embryonnaire, nous utiliserons certaines données biochimiques ou cytochimiques acquises par d'autres auteurs, données auxquelles nous nous référerons fréquemment et qu'il nous paraît nécessaire de rappeler ici. Ces données ont été essentiellement obtenues au cours d'études biochimiques de culots d'ultracentrifugation de cellules sécrétant des stéroïdes.

C'est ainsi que l'on s'est efforcé de localiser au niveau des différents organites (ergastoplasme, réticulum endoplasmique, mitochondrie) de ces cellules, les enzymes impliquées dans les différentes étapes de la biosynthèse des stéroïdes.

Ces enzymes sont localisées dans la fraction microsomiale, dans la fraction mitochondriale et dans le surnageant : fraction contenant les composants solubles de la matrice cytoplasmique.

FAWCETT, LONG et JONES (1969) ont souligné le fait que l'on n'a pas distingué dans la fraction microsomiale le réticulum lisse du réticulum granulaire, ils ont également remarqué que cette dernière fraction étant un composant si faible, si une activité enzymatique est localisée à la fraction microsomiale, elle doit résider principalement dans le réticulum lisse.

FAWCETT, LONG et JONES ont rassemblé les données sur ces études enzymatiques et ont relié schématiquement les différentes étapes de la synthèse des stéroïdes aux organites cellulaires (voir schéma page suivante²).

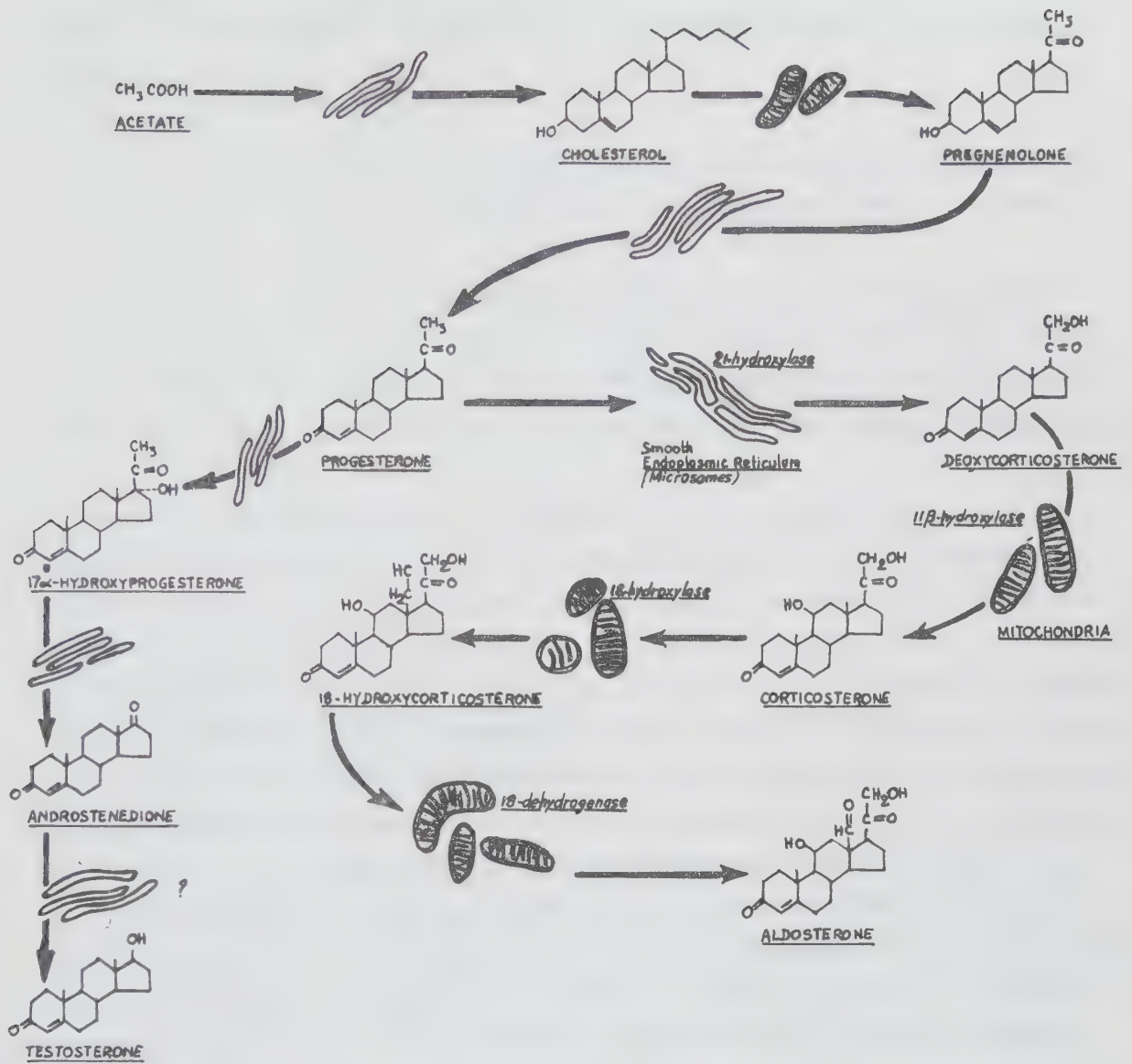
La synthèse du cholestérol à partir d'acétate nécessite des enzymes situées dans les membranes du réticulum lisse, ou dans la matrice cytoplasmique.

La chaîne latérale du cholestérol est ensuite clivée par des réactions d'hydroxylation s'effectuant au niveau des mitochondries.

La prégnenolone qui en résulte est transformée en progestérone sous l'action d'enzymes résidant dans le réticulum ou dans la matrice cytoplasmique.

A partir de la progestérone une voie conduit à la formation des stéroïdes surrénaliens, et une voie à la formation des androgènes.

La formation des stéroïdes surrénaliens à partir de la progestérone est effectuée par une série d'hydroxylations. La première hydroxylase (21



SCHEMA RELIANT LES DIFFERENTES ETAPES DE LA SYNTHSE DES STEROIDES AUX ORGANITES CELLULAIRES D'APRES LONG et JONES (1970)

hydroxylase) étant localisée dans le réticulum endoplasmique, les autres enzymes (11 β hydroxylase, 18 hydroxylase et 18 déhydrogénase) étant mitochondriales.

- La formation des androgènes débute par celle de l'androsténone, elle est effectuée par hydroxylation de la progestérone et clivage de la chaîne à deux carbones.

Les étapes principales allant de l'acétate à la testostérone sont effectuées à l'aide d'enzymes situées au niveau du réticulum lisse ou de la matrice cytoplasmique. Dans cette voie il n'y a que l'étape de clivage de la chaîne latérale du cholestérol qui est catalysée par des enzymes mitochondriales.

Les travaux concernant l'histologie du cortex surrénal ont été très nombreux chez les Mammifères ; en microscopie électronique les premières publications sont celles de LEVER en 1955 qui étudie le cortex surrénal du Rat, de la Souris, du Hamster et du Lapin. Les très nombreuses publications qui ont suivi (BRAUNSTEINER 1955, BELT et PEASE 1956, ZELANDER 1957, DE ROBERTIS et SABATINI 1958, ASHWORTH, RACE et MOLLENHAUER 1959, CARR 1958, 1959, 1961, LUSE 1961 etc...) étaient des études descriptives ultrastructurales des différentes zones du cortex surrénal des Mammifères et des caractères des organites cellulaires.

Chez la Poule, KAR (1947) avait recherché en microscopie optique une zonation éventuelle des cellules corticales, il avait observé que celles-ci étaient quelquefois plus grandes dans la région périphérique que dans la région centrale de la glande. Puis en 1951, KNOUFF et HARTMAN décrivent une zonation chez le Pélican brun. En 1942 MILLER et RIDDLE et en 1961 SINHA et GHOSH distinguent dans les cellules interrénales du Pigeon une zone subcapsulaire et une zone interne. SIVARAM (1965) note également en microscopie optique que les cellules corticales périphériques contiennent un plus grand nombre de mitochondries que les cellules de la zone centrale.

Les travaux de DE ROOS (1960, 1961, 1964) démontrent la présence de glucocorticoïdes et d'aldostérone dans les glandes surrénales de divers Oiseaux. GHOSH (1962) par des méthodes histochimiques démontre une zonation dans les surrénales de certaines espèces d'Oiseaux, tandis que KONDICS (1963) en décrit une seulement chez quelques Pigeons examinés.

Les auteurs qui avaient conclu à une zonation des cordons corticaux

ont cherché à vérifier expérimentalement ce fait. KONDICS (1963) a trouvé qu'après administration de ClNa des changements atrophiques se produisaient dans la zone subcapsulaire des surrénales de Pigeon. Pour cet auteur l'aldostérone serait donc probablement produite par la zone subcapsulaire et les glucocorticoïdes par la zone profonde, la zone subcapsulaire correspondrait à la glomérulée et la zone interne à la fasciculée des Mammifères. Par contre, SINHA et GHOSH (1964) au cours de la même expérimentation chez le même animal, trouvent une atrophie de la zone interne et pensent que l'aldostérone est produite par la zone interne des cellules interrénales.

En microscopie électronique, FUJITA (1961) est le premier auteur à étudier les cellules corticales de la glande surrénale de la Poule puis FUJITA, MAKINO et TOKURA (1963), décrivent les organites de la cellule corticale : mitochondries, vacuoles, "microbodies", gouttelettes osmiophiles, mais les auteurs ne trouvent aucune différence en microscopie électronique entre les cellules corticales de la périphérie de la glande et celles de la partie centrale.

Les auteurs rapportent également leurs observations sur la formation des mitochondries et sur la formation des lipides dans les cellules interrénales de la Poule. Certaines gouttelettes lipidiques pourraient être élaborées par les mitochondries, tandis que d'autres s'accumuleraient dans les vacuoles cytoplasmiques considérées comme du réticulum endoplasmique, les mitochondries auraient un rôle probable dans leur élaboration.

Les gouttelettes osmiophiles ne sont trouvées par FUJITA que chez la Poule et il n'observe aucune de ces formations chez le Poulet et l'embryon. Il note pourtant la discordance entre un caractère histochimique et un caractère morphologique : la soudanophilie est très nette chez les embryons de Poulet de 15 jours et aucune gouttelette osmiophile n'est retrouvée à l'échelle ultrastructurale dans les cellules corticales embryonnaires, ces cellules ne contenant que mitochondries et vacuoles. L'auteur pense que les lipides impliqués dans l'élaboration des hormones corticales ne sont pas osmiophiles chez l'embryon et le Poulet.

De tous les travaux réalisés chez les Mammifères en microscopie électronique il semble bien que la morphologie des mitochondries soit la meilleure base ultrastructurale de distinction entre les différentes zones de la corticosurrénale. Ce critère est utilisé par KJAERHEIM et KONDICS (1966) pour distinguer deux zones dans les cellules interrénales de la surrénale de la Poule :

une zone subcapsulaire où les mitochondries sont le plus souvent ovales ou allongées, à crêtes tubulaires, et une zone interne où la plupart des mitochondries sont rondes de plus grande taille que celles de la zone subcapsulaire, à crêtes tubulaires ou tubulo-vésiculaires et dans lesquelles les tubules sont en plus grand nombre que dans les mitochondries de la zone subcapsulaire.

SHERIDAN, BELT et HARTMAN (1963) étudient en microscopie électronique la glande surrénale du Pélican brun puis en 1965 BELT, SHERIDAN, KNOUFF et HARTMAN publient leur hypothèse sur un mécanisme possible de sécrétion des cellules interrénales : les gouttelettes lipidiques intra-cytoplasmiques seraient libérées dans l'espace intercellulaire situé sur les faces latérales de la cellule, puis elles se déplaceraient vers la partie apicale de cet espace et seraient libérées dans l'espace subendothélial où une "rupture" de la paroi endothéliale permettrait leur passage dans le vaisseau.

KJAERHEIM à partir de 1968 publie une étude très complète sur l'ultrastructure des cellules interrénales de la Poule. Sa technique améliorée grâce à la fixation par perfusion de glutaraldéhyde permet tout d'abord de supprimer l'aspect de cellules "claires" et de cellules "sombres" antérieurement décrit par de nombreux auteurs et considéré même à présent par certains auteurs comme deux états fonctionnels de la cellule. Cette technique permet également à KJAERHEIM d'éliminer tous les artéfacts produits par les mauvaises fixations des organites cellulaires.

L'étude de l'ultrastructure de la surrénale embryonnaire du Poulet n'a pas été réalisée, et au début de nos recherches seules les publications de FUJITA (1961, 1963) étaient connues.

Il était intéressant d'étudier le développement embryonnaire de cette glande, sur le plan ultrastructural et sur le plan histochimique, de rechercher à l'échelle ultrastructurale les caractères traduisant l'apparition de la stéroïdogénèse chez l'embryon et d'acquérir ainsi des données sur la maturation fonctionnelle des cellules corticales.

B) - CARACTERES MORPHOLOGIQUES OPTIQUES

Chaque glande est entourée par une capsule conjonctive richement vascularisée et innervée.

Si nous examinons au microscope optique une coupe de surrenale de Poulet fixée pour la réaction phéochrome, mettant en évidence toutes les cellules médullaires, nous voyons très nettement l'organisation de deux constituants fondamentaux : le tissu cortical et le tissu médullaire (Planche III Figure 9).

Le tissu cortical forme des cordons ou des îlots dispersés dans le tissu médullaire organisé de préférence en travées cellulaires ou en petits groupes irréguliers de cellules. Chaque cordon cortical, entouré de fibres conjonctives, est formé d'une double rangée de cellules renfermant un noyau arrondi à un ou deux nucléoles, leur cytoplasme contient des gouttelettes lipidiques généralement extraites par les techniques habituelles, mais en observant une coupe de surrenale fixée selon la technique d'ELFTMAN et colorée au noir Soudan B qui met en évidence les lipides, on voit que ceux-ci sont très nombreux et que la plupart sont groupés vers le pôle basal de la cellule, ce qui détermine un liséré lipidique qui borde le cordon cortical (Planche III Figure 10).

Parmi ces deux constituants se trouvent de nombreux capillaires tandis que de grands sinus sont observés au centre de la glande.

C) - CARACTERES MORPHOLOGIQUES ULTRASTRUCTURAUX

Nos observations ont été faites à partir du 5ème jour d'incubation. A ce stade en microscopie optique, les cellules corticales forment des petites masses dans le mésenchyme. En microscopie électronique, ce sont de grosses cellules arrondies avec un noyau volumineux, la mince bande cytoplasmique révèle peu d'organites : quelques mitochondries, un peu de réticulum endoplasmique lisse et d'ergastoplasme (réticulum endoplasmique granulaire) au contact des mitochondries, une grande richesse en ribosomes et quelques petites gouttelettes lipidiques.

Au 6ème jour d'incubation, (Planche III Figure 11) les cellules corticales perdent leur forme arrondie et deviennent irrégulières, pentagonales ou hexagonales, elles émettent des digitations et des microvillosités mais il n'y a encore aucun point de contact entre les cellules, qui ont tendance à se rassembler par petits groupes de 6 ou 8 pour former de petits cordons. Leur noyau n'est plus aussi régulier. Il y a peu de changements dans les organites, les mitochondries sont allongées ou ovales, les gouttelettes lipidiques ou liposomes (3 ou 4 par cellule) sont de forme arrondie et de faible densité. C'est à

PLANCHE III

PLANCHE III

Figure 9 : Poulet 3 mois. Réaction phéochrome au bichromate-chromate.

Coloration bleu de toluidine.

On reconnaît l'organisation définitive des cordons corticaux et des cordons médullaires.

CC : cordon cortical. (x 100)

Figure 10 : Embryon 17 jours d'incubation. Fixation Elftman destinée à conserver les lipides rendus préalablement insolubles. Coloration noir Soudan B.

La majeure partie des lipides apparaît localisée à la périphérie des cordons corticaux ; on observe cependant quelques inclusions dans la partie centrale des cordons.

CC : cordon cortical. (x 250)

Figure 11 : Embryon 6 jours d'incubation.

Cellule corticale encore peu différenciée. On note cependant la présence de nombreuses mitochondries.

M : mitochondrie ; Mv : microvillosité ; N : noyau. (x 5 000)

Figure 12 : Embryon 7 jours d'incubation.

Organites de la cellule corticale.

M : mitochondrie ; G : appareil de Golgi ; (—) : microfilaments.

(x 17 000)

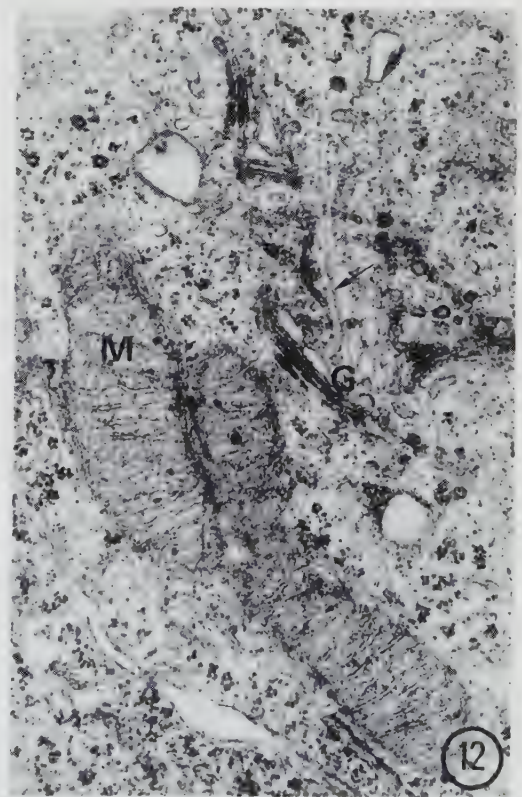
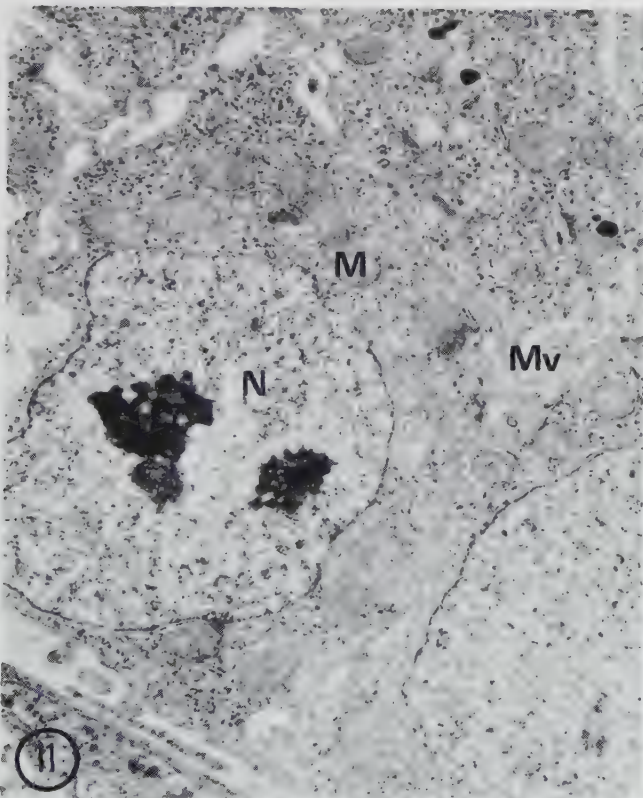
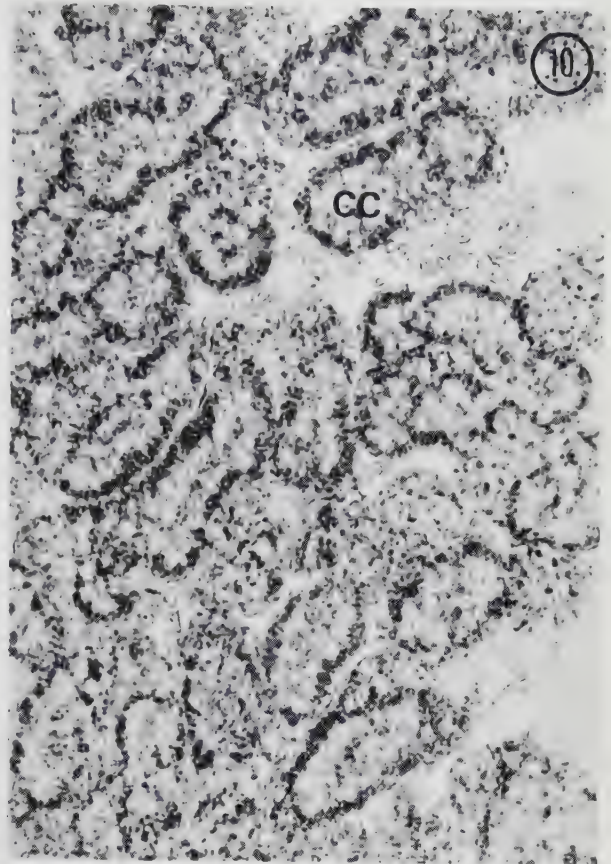
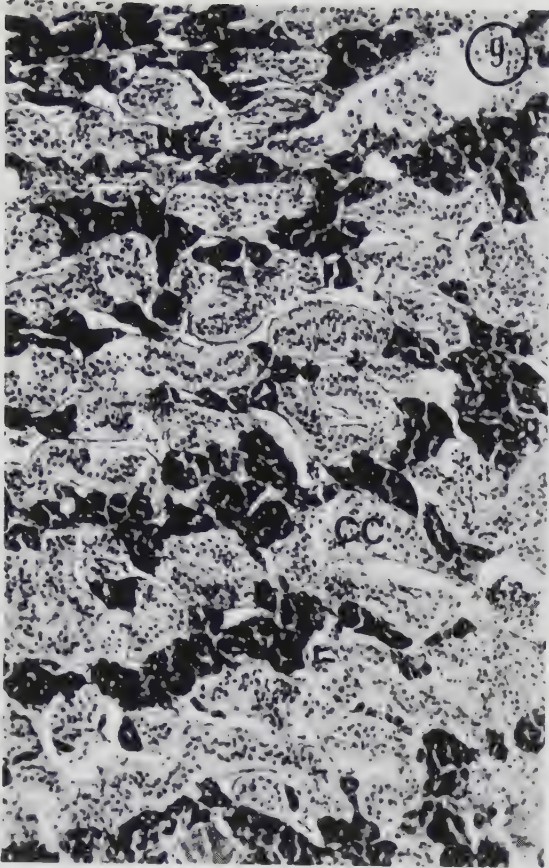


PLANCHE IV

PLANCHE IV

Figure 13 : Embryon 7 jours d'incubation.

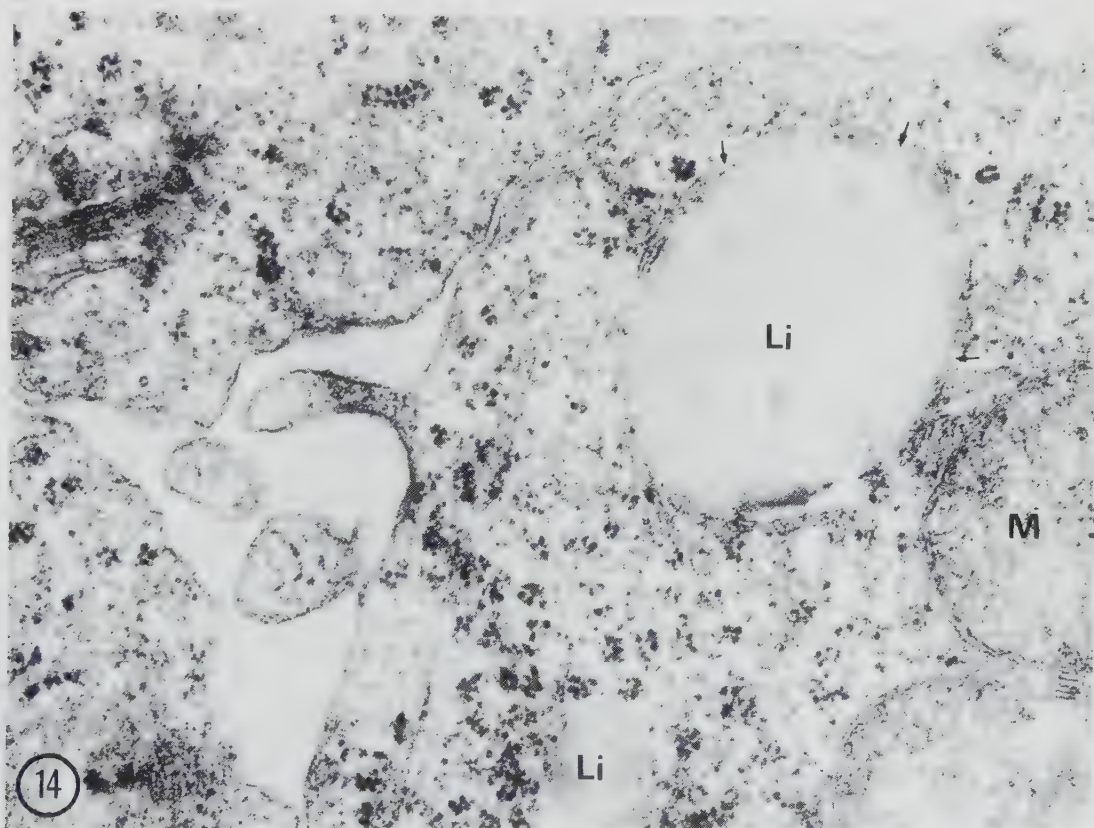
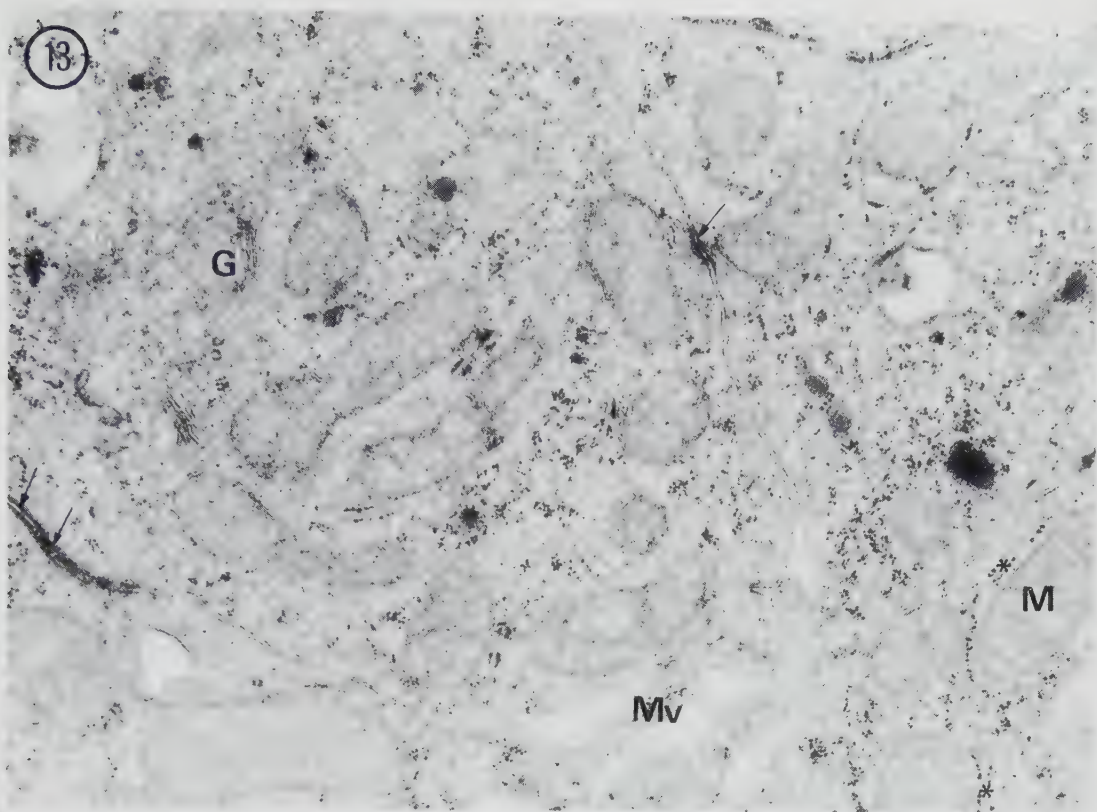
Cellules corticales pôle apical. Les cellules corticales sont en contact au niveau de zones différenciées de type zonula adherens (→). On note de fréquentes associations de l'ergastoplasme (réticulum granulaire) entourant les mitochondries.

* : ergastoplasme ; G : appareil de Golgi ; M : mitochondrie ;
Mv : microvillosité. (x 10 000)

Figure 14 : Embryon 11 jours d'incubation.

Cellule corticale. La microphotographie est destinée à montrer la présence d'un liposome entouré par des tubules du réticulum endoplasmique lisse (→).

Li : liposome ; M : mitochondrie. (x 20 000)



ce stade que les cellules médullaires arrivent au contact des ébauches corticales

Au 7ème jour d'incubation, les cellules corticales se sont multipliées et les cellules adjacentes présentent sur leurs faces latérales des zones de contact (zonula adherens et zonula occludens) tandis que les parties apicales émettent des digitations (Planche IV Figure 13). Le noyau allongé présente des indentations, il occupe toujours la plus grande partie de la cellule. Le cytoplasme très riche en ribosomes contient un peu plus de réticulum granulaire à proximité des mitochondries (Planche IV Figure 13) qui sont de forme plus variable, le plus souvent allongées à crêtes régulières parallèles. On distingue à présent dans le cytoplasme du réticulum lisse, des microtubules, des filaments et au voisinage du noyau un appareil de Golgi composé de 2 ou 3 saccules et de petites vésicules (Planche III Figure 12). On voit également parfois un cil intra-cytoplasmique faisant saillie dans l'espace intercellulaire.

Les gouttelettes lipidiques de taille un peu inférieure à celle des mitochondries, sont toujours peu denses aux électrons, mais dans quelques cellules on voit des globules plus denses limités par une membrane.

Au 8ème jour d'incubation, les caractères ultrastructuraux sont les mêmes qu'au stade précédent dans les cellules corticales qui se sont multipliées.

Aux 9ème et 10ème jour, les flots corticaux sont bien dessinés. Les cellules corticales sont plus étroitement en contact les unes avec les autres par leurs faces adjacentes. Les parties apicales des cellules émettent de nombreuses digitations et microvillosités qui commencent à entrer en contact, laissant un espace intercellulaire encore assez important. On trouve également de nombreuses microvillosités dans les espaces périendothéliaux.

Le réticulum endoplasmique lisse se développe. Il est formé par de courts tubules qui entourent parfois les mitochondries et les liposomes (Planche IV Figure 14).

On observe des vacuoles granulaires ou lisses, certaines semblent être des vacuoles de pinocytose qui se forment à partir de la membrane cellulaire, à la partie apicale, au niveau des espaces intercellulaires, d'autres vacuoles proviennent des saccules golgiens.

Aux 11ème et 12ème jours d'incubation, les organites cellulaires ont évolué. Le trait le plus caractéristique est l'augmentation du nombre de mitochondries et de liposomes (Planche V Figure 15) ; ces derniers situés de préférence à la partie basale de la cellule confèrent à celle-ci une polarité (Planche V Figure 16). La plupart des liposomes sont pleins, à contenu moyennement dense aux électrons (Planche V Figure 16).

Les mitochondries irrégulières, parfois en forme de Y, parfois allongées et présentant un étranglement, sont de plus grande taille que précédemment, leurs crêtes tubulaires parallèles sont plus nombreuses, leur matrice contient fréquemment des granules denses.

A la partie apicale de la cellule on distingue souvent 1 ou 2 appareils de Golgi à saccules courts mais donnant naissance à de nombreuses petites vésicules ; certaines vésicules dans cette partie de la cellule sont emplies d'un matériel dense homogène, on observe également dans cette région quelques gouttelettes lipidiques et des cils intracytoplasmiques.

Le réticulum granulaire est accolé aux mitochondries. Les tubules du réticulum lisse sont dispersés dans le cytoplasme (Planche V Figure 16) et accolés aux liposomes et aux mitochondries.

Aux 14ème et 15ème jours, la glande a acquis un aspect compact. Les cordons corticaux se sont multipliés et sont bien individualisés, entourés par du tissu conjonctif qui les sépare des vaisseaux sanguins et des autres cordons voisins. Les cellules corticales sont en contact en de nombreux points. Les interdigitations sont étroitement entremêlées. La polarité des cellules est très nette : le noyau est situé dans la moitié supérieure de la cellule, tandis que la majorité des liposomes et des mitochondries occupent la moitié inférieure.

La différence ultrastructurale principale par rapport au stade précédent est le changement d'aspect des mitochondries : jusqu'alors elles étaient de même densité que le cytoplasme, elles sont à présent de plus grande densité que ce dernier, leurs crêtes ont une structure plus complexe : dans la majorité des mitochondries quelques tubules sont parallèles et les autres sont enchevêtrés. Parfois dans certaines cellules on voit plusieurs mitochondries allongées étirées en leur centre et aux deux extrémités renflées. Cet aspect est également rencontré dans des cellules en division.

Les liposomes se présentent sous trois aspects : dense, optiquement

PLANCHE V

PLANCHE V

Figure 15 : Embryon 11 jours d'incubation.

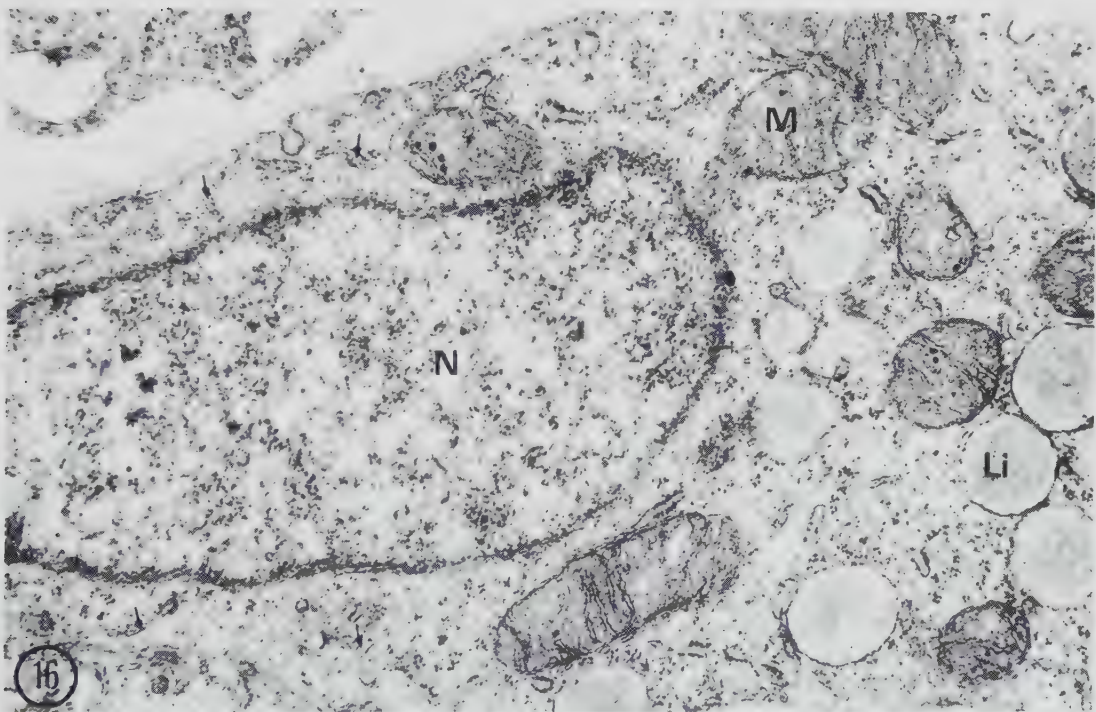
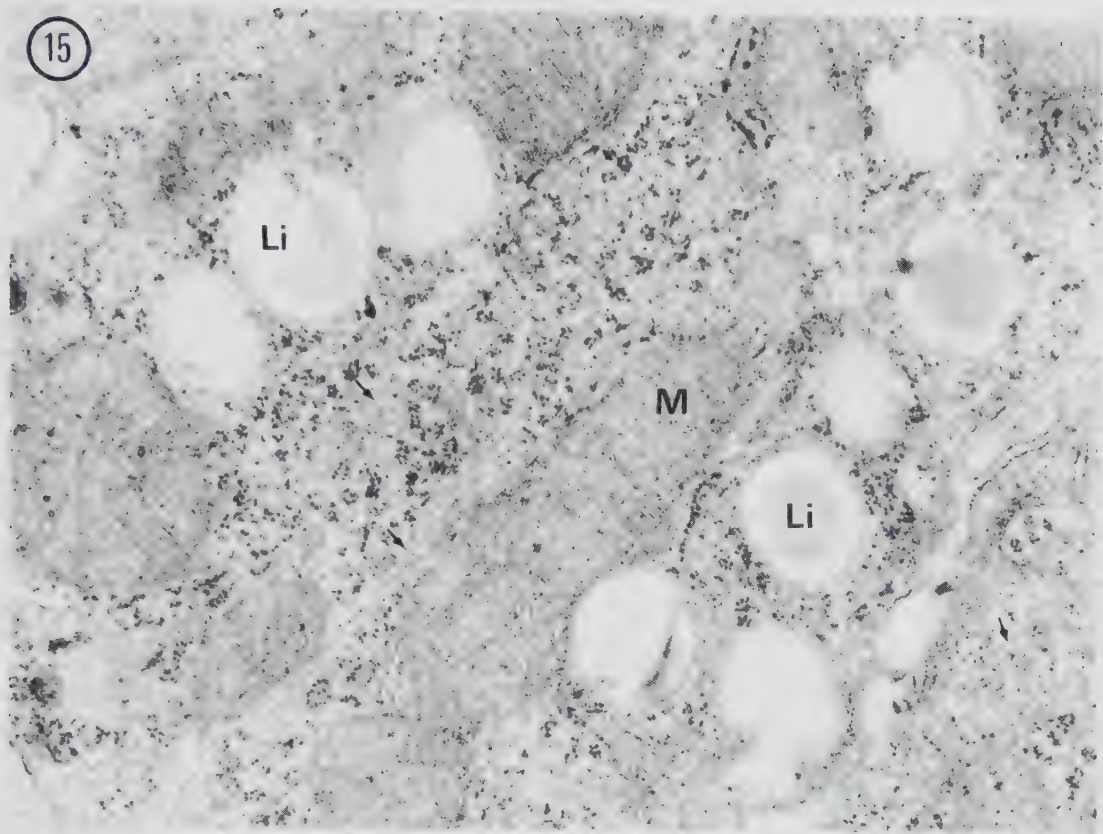
On note l'augmentation du nombre des liposomes et la grande richesse en ribosomes du cytoplasme.

Li : liposome ; M : mitochondrie ; (—→) : microfilaments. (x 14 000)

Figure 16 : Embryon 11 jours d'incubation.

La plupart des inclusions lipidiques et des mitochondries sont situées au pôle basal de la cellule (à droite de la microphotographie).

(—→) : réticulum endoplasmique ; Li : liposome ; M : mitochondrie ; N : noyau. (x 12 000)



vide avec une périphérie dense, et multivacuolaire.

Le réticulum granulaire est peu important, par contre le réticulum lisse est observé dans tout le cytoplasme et autour des liposomes.

Du 16ème au 18ème jour, la croissance de la glande surrénale est très importante, elle a acquis l'organisation qu'elle présentera au moment de l'éclosion. Les modifications essentielles à l'échelle ultrastructurale intéressent les liposomes et les mitochondries.

A ce stade les liposomes de la partie basale de la cellule sont en très grand nombre, fréquemment accolés les uns aux autres, ils ne sont séparés des mitochondries que par les tubules du réticulum endoplasmique lisse, ces liposomes sont clairs, il n'existe qu'un très mince liseré dense à leur périphérie.

Par contre à la partie apicale de la cellule, les liposomes peu nombreux sont de petite taille, légèrement denses, ou multivacuolaires, les mitochondries sont toujours de plus grande densité que le cytoplasme, ovales ou arrondies, mais on peut observer des mitochondries allongées et irrégulières dans tous les cordons. Leur structure interne est composée de crêtes tubulaires et de petits faisceaux de crêtes parallèles ; des tubules peuvent former une structure régulière mais ces figures sont très rares (une seule observation chez un embryon de 18 jours).

A l'éclosion et au cours des jours suivants, les cellules corticales présentent ces caractères :

- Les membranes plasmatiques des cellules corticales adjacentes sont en contiguité et présentent le long de leur trajet des différenciations en zonula adherens et zonula occludens, celles-ci sont surtout observées dans les parties apicales des cellules qui sont en contact par des interdigitations sinueuses. Il reste encore des espaces intercellulaires au pôle apical des cellules dans lesquels se projettent des microvillosités.

- Le noyau arrondi ou ovale présente quelquefois des indentations. Il contient un ou deux nucléoles pelotonnés, composés d'un matériel granulaire, et parfois des corps nucléaires de densité variable.

- Les mitochondries très nombreuses sont de forme variable, arrondies ou allongées, rectilignes ou en haltère, il semble qu'au cours des derniers jours de l'incubation et à l'éclosion, on rencontre plus de mitochondries

arrondies ou ovales dans les cordons centraux que dans les cordons périphériques, où elles ont plus tendance à être de forme variable. La matrice mitochondriale contient fréquemment de petits corps denses homogènes (Planche VI Figure 19) ou à structure granulaire plus dense en périphérie. Nous avons également observé des petits corpuscules de la taille d'un ribosome.

Les crêtes sont tubulaires très claires, rectilignes ou enchevêtrées aux extrémités dilatées (Planche VI Figure 19), en coupe transversale, elles apparaissent sous forme de petites vésicules ; fréquemment 2 ou 3 crêtes sont disposées parallèlement les unes aux autres formant un petit faisceau. Rarement certains tubules sont assemblés pour former une trame régulière. Lorsque la mitochondrie est étirée en haltère les crêtes parallèles sont disposées suivant l'axe de l'allongement.

- Le réticulum endoplasmique lisse sous forme de tubules entoure les liposomes et les mitochondries.

- L'ergastoplasme est moins fréquent à l'éclosion que dans les jeunes stades.

- Les ribosomes sont toujours en grand nombre dans le cytoplasme.

- Les inclusions lipidiques sont très nombreuses dans toutes les cellules, leur taille et leur densité varient : la même cellule renferme dans sa partie basale de grands liposomes très clairs à périphérie dense (Planche VI Figure 19) et dans sa partie apicale de petits liposomes denses (Planche VI Figure 17) ou multivacuolaires.

- Des microtubules droits isolés sont rencontrés dans tout le cytoplasme.

- L'appareil de Golgi toujours situé près du noyau dans la partie apicale de la cellule est bien développé. Le nombre de vésicules entourant les saccules golgiens est très important (Planche VI Figures 18 et 20).

- Les organites déjà rencontrés dans les stades jeunes sont présents : cils intracytoplasmiques faisant saillie dans l'espace intercellulaire, corps multivésiculaires, corps denses homogènes et corps complexes entourés par une membrane et renfermant du matériel lipidique et du matériel granulaire (Planche VI Figures 17 et 20)

PLANCHE VI

PLANCHE VI

Figure 17 : Poussin 6 jours. Cellule corticale. Pôle apical montrant des mitochondries, quelques inclusions lipidiques de petite taille et plusieurs corps complexes : inclusions renfermant un matériel dense vacuolaire.

C : corps complexe ; Li : liposome ; M : mitochondrie. (x 5 000)

Figure 18 : Poussin 6 jours. Cellule corticale. Pôle apical. La microphotographie montre plusieurs appareils de Golgi, des mitochondries à crêtes tubulaires, des ribosomes disposés en "rosette".

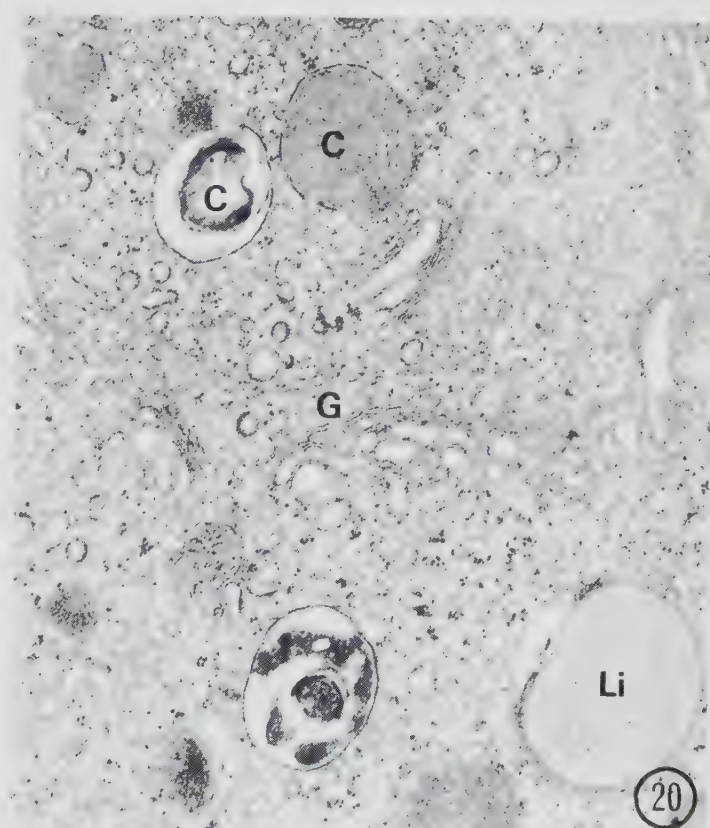
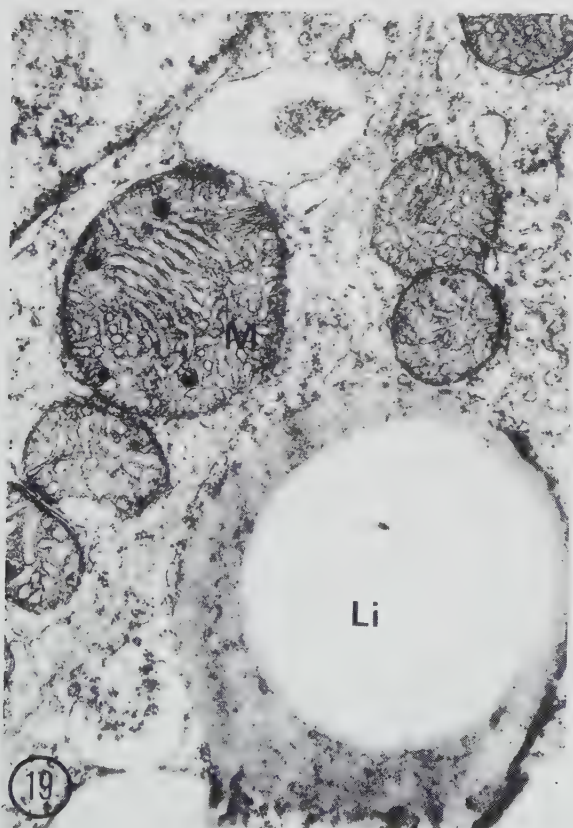
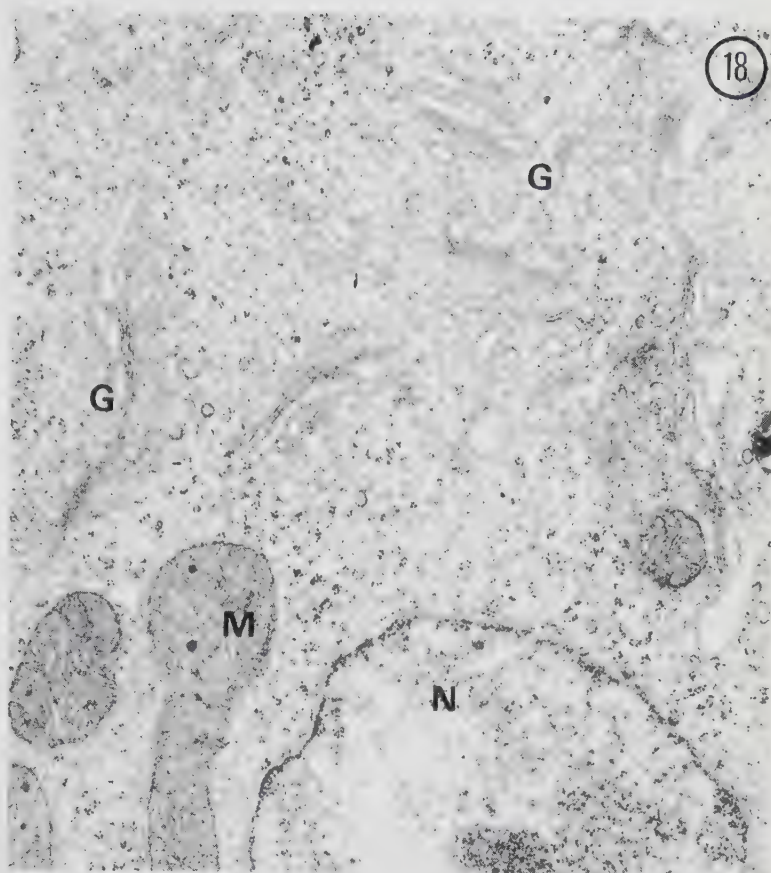
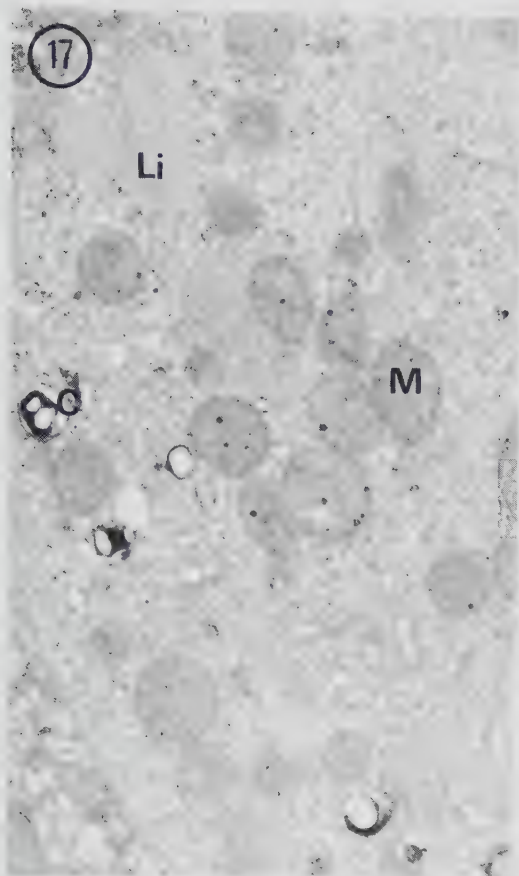
G : appareil de Golgi ; M : mitochondrie ; N : noyau. (x 8 000)

Figure 19 : Poussin 4 jours. Cellule corticale. On observe une volumineuse enclave lipidique à coque dense et des mitochondries à crêtes tubulaires qui renferment des grains denses.

Li : liposome ; M : mitochondrie. (x 10 000)

Figure 20 : Poussin 6 jours. Cellule corticale. Pôle apical montrant une zone de Golgi avec de nombreuses vésicules, et des corps complexes constitués d'un matériel dense, finement granulaire.

C : corps complexe ; G : appareil de Golgi ; Li : liposome.
(x 10 000)



D) - DISCUSSION

Plusieurs points importants sont à dégager de cette étude ultrastructurale.

1°) - LE PROBLEME DE L'EXISTENCE DES CELLULES "CLAIRES" ET DES CELLULES "SOMBRES"

Dans la corticosurrénale, ces "types" cellulaires ont été très souvent cités par de nombreux auteurs, non seulement dans les surrénales adultes mais aussi, dans les surrénales embryonnaires [IDELMAN (1966) chez le foetus de Rat ; ROSS (1962) chez le foetus humain ; JOHANNISSON (1968) chez l'embryon humain à partir de la 10ème semaine de gestation.] Or nous n'avons pas observé ces aspects dans les cellules corticales de l'embryon de Poulet.

Deux hypothèses peuvent expliquer ce fait :

a) - Si les cellules "claires" et les cellules "sombres" de DA COSTA (1952) correspondent à une étape d'un cycle fonctionnel, l'absence d'une telle observation chez des embryons signifierait que les cellules de la corticosurrénale n'ont pas atteint leur maturité fonctionnelle.

DA COSTA considèrerait que les cellules sombres auraient libéré leurs lipides et que lors d'une nouvelle phase du cycle la cellule élaborerait à nouveau du matériel lipidique et reprendrait un aspect clair.

Ce "dichroïsme" de DA COSTA a été également décrit par LEVER (1955) dans le cortex surrénal, mais cet auteur a une opinion contraire à celle de DA COSTA : la cellule foncée serait une cellule qui commencerait à élaborer et la cellule claire excréterait ses lipides. NISHIKAWA (1963) a également considéré les cellules sombres comme des cellules actives.

GRANT (1960) pense que les cellules claires contiennent du cholestérol sous forme estérifiée, et les cellules foncées du cholestérol sous forme libre.

SYMINGTON (1960) pense que la cellule foncée observée seulement dans la réticulée, secrèterait des stéroïdes, la cellule claire ne stockerait que les précurseurs des stéroïdes (cholestérol) mais cette hypothèse est en désaccord avec la localisation de la $\Delta 5 - 3\beta$ HSDH dans toute la surrénale [WATTENBERG (1958), LEVY, DEANE et RUBIN (1959).]

D'autres arguments sont venus étayer cette hypothèse de cycle fonctionnel, ce sont les modifications du dichroïsme cellulaire au cours d'expérimentations.

LEVER (1956) a constaté la diminution du nombre de cellules foncées dans la fasciculée interne et dans la réticulée après hypophysectomie et leur réapparition lorsqu'on injecte de l'ACTH. La même observation a été faite après hypophysectomie par SCHWARZ (1962) les cellules sombres seraient donc des cellules actives, mais ces cellules disparaissent aussi après stimulation par privation de sodium, ce qui suggère que les cellules claires sont des formes actives (GIACOMELLI et Coll. 1965).

b) - Nous pensons que les cellules claires et les cellules foncées peuvent représenter un artéfact de fixation. Leur absence dans la surrénale embryonnaire résulterait d'une bonne fixation presque immédiate et d'une dissection plus rapide à effectuer chez l'embryon de Poulet que chez l'adulte. Il n'y aurait donc pas d'artéfact résultant des conditions d'oxygénation des cellules au moment du prélèvement.

Des arguments sont en faveur de cette hypothèse : nous avons personnellement observé au début de nos recherches ces "types" cellulaires chez des Poulets âgés ; cette observation a d'ailleurs été faite chez la Poule par KJAERHEIM et KONDICS (1966) puis ces auteurs ont utilisé des fixations par perfusion de glutaraldéhyde, ainsi fixées toutes les cellules de la corticosurrénale ont un aspect uniforme et sont de même densité. KJAERHEIM a donc constaté que ces différences de densité reflétaient des artéfacts de fixation et non l'état fonctionnel des cellules. Il fait remarquer que de telles différences s'observent dans des conditions osmotiques non physiologiques ce qui suggère que des phénomènes osmotiques peuvent aussi être responsables de l'aspect de cellules claires et de cellules sombres.

2°) - EVOLUTION DES CARACTERES ULTRASTRUCTURAUX DES ORGANITES CELLULAIRES

Nous avons vu que les organites sont mis en place très précocement dans la surrénale embryonnaire puisque dès le 6ème jour d'incubation les cellules corticales renferment des mitochondries, du réticulum endoplasmique lisse et des liposomes. Ces organites évoluent ensuite non seulement en quantité mais aussi dans leur morphologie et leur structure.

Mitochondries

Leur nombre s'accroît de façon importante entre 12 et 15 jours et nous avons vu que de nombreuses étapes de la biosynthèse des stéroïdes nécessitent des enzymes mitochondriales.

A tous les stades du développement, des mitochondries de forme irrégulière sont observées dans les cordons périphériques et centraux. A partir du 15ème jour d'incubation on rencontre plus de mitochondries arrondies ou ovales, et à l'éclosion ces formes sont surtout localisées dans les cordons centraux. Il est donc difficile d'affirmer sur une seule base morphologique qu'une zonation existe dès les stades embryonnaires, ce n'est qu'à partir de l'éclosion que s'ébauche une zonation basée sur la morphologie des mitochondries.

KONDICS et KJAERHEIM (1966) ont reconnu une zonation dans les cordons de la corticosurrénale de la Poule âgée de 18 mois à 2 ans, basée sur la forme des mitochondries. Les cordons situés à la périphérie de la glande c'est à dire, dans une mince zone subcapsulaire renfermant des mitochondries de forme le plus souvent allongée avec un nombre de crêtes modéré, tandis que les cordons de la zone interne renferment des mitochondries rondes ou ovales avec un grand nombre de crêtes tubulaires.

Au début du développement les mitochondries contiennent des crêtes lamellaires, au 15ème jour on observe des mitochondries qui renferment des crêtes tubulaires, leur nombre est important à partir du 18ème jour.

De nombreux auteurs ont noté la présence de mitochondries à structure tubulaire dans les cellules produisant des stéroïdes (corticosurrénale, cellules interstitielles du testicule, follicule de DE GRAAF, corps jaune). BELT et PEASE (1956) ont suggéré que les crêtes tubulaires intramitochondriales sont typiques des cellules produisant des stéroïdes et que sous cette forme, l'augmentation de la surface interne de la mitochondrie peut être en relation avec l'activité enzymatique de la membrane mitochondriale et donc avec la synthèse des stéroïdes.

En plus des crêtes tubulaires ces mitochondries renferment des lamelles parallèles dont le rôle est inconnu. KONDICS et KJAERHEIM 1966 ont remarqué qu'on observe ces lamelles dans des mitochondries contenant de nombreux tubules serrés et que ces membranes doivent être formées par compression des tubules.

L'arrangement des tubules suivant une trame paracristalline est rarement observée chez le Poussin à l'éclosion (1cas) rarement également chez la

Poule alors qu'elle l'est plus souvent dans le cortex surrénal de Rat. KJAERHEIM (1967) faisant remarquer que quelques protéines sont capables de former des trames paracristallines d'éléments tubulaires a suggéré que les paracristaux observés dans la matrice mitochondriale pouvaient être des protéines.

Nous n'avons jamais observé dans notre matériel embryonnaire de mitochondries donnant naissance à des vésicules, ou émettant des projections de leurs membranes dans des organites voisins (liposomes par exemple ou autres mitochondries). Au cours de travaux en microscopie électronique de nombreux auteurs ont lié ces images à l'élaboration des stéroïdes mais les perfectionnements des techniques de fixation ont montré que de telles images ne sont en fait que des artéfacts.

De nombreux auteurs ont également décrit des mitochondries vésiculaires ou tubulovésiculaires notamment dans les zones fasciculée et réticulée du Rat (SABATINI et DE ROBERTIS 1961 ; SCHWARZ, MERKER et SUCHOWSKY 1962, NISHIKAWA, MURONE et SATO 1963, IDELMAN 1966).

Ces vésicules correspondent à des crêtes tubulaires coupées transversalement, elles peuvent aussi provenir de la transformation de certaines crêtes. On a d'ailleurs rapporté les changements de structure des mitochondries au cours d'expérimentations : après hypophysectomie, des mitochondries vésiculaires du cortex surrénal de Rat deviennent tubulaires ou tubulovésiculaires (SABATINI, DE ROBERTIS, BLEICHMAR 1962), après action de l'ACTH, la mitochondrie redevient vésiculaire.

Il a été vérifié que des changements morphologiques et structuraux dépendent de l'état fonctionnel des surrénales (NISHIKAWA, MURONE et SATO 1963). Nous approfondirons cette question dans notre étude expérimentale.

Dans nos observations nous avons souligné le fait que l'on remarque fréquemment des tubules de réticulum endoplasmique lisse situés autour des mitochondries et autour des liposomes, de même que mitochondries et liposomes sont également quelquefois accolés.

Ces images sont interprétées comme des signes d'activité de synthèse stéroïdienne. Il y a évidemment une restriction à cette interprétation c'est que la densité de ces organites dans certaines cellules est telle qu'il ne peut qu'exister des rapports de contiguité entre eux.

Réticulum endoplasmique

Il est présent au 6ème jour de l'incubation et se développe principalement entre 10 et 12 jours, il est constitué de tubules plus ou moins longs disséminés dans tout le cytoplasme et qui se trouvent à la périphérie des mitochondries et des liposomes.

Son aspect tubulaire ou vacuolaire a été très discuté. Lors des premières observations en électronique, on le décrivait comme constitué de vacuoles mais avec des conditions de fixation améliorées, il apparaissait alors comme formé de tubules (CHRISTENSEN 1965, LONG et JONES 1967). Ces auteurs défendent cette hypothèse en faisant remarquer qu'il est plus logique de penser que des vacuoles peuvent prendre naissance à partir du réticulum endoplasmique tubulaire plutôt que d'imaginer la formation de tubules à partir de vacuoles, ce changement exigeant alors une dépense d'énergie.

Le réticulum endoplasmique lisse n'est pas propre aux cellules de la corticosurrénale, on le trouve également dans d'autres cellules élaborant des stéroïdes par exemple dans les cellules interstitielles du testicule (CHRISTENSEN 1965) dans les cellules "lutéiniques" du corps jaune et dans celles de la granulosa (BLANCHETTE 1966, BJERSING 1967, COHERE 1967), on le trouve aussi dans les cellules de la corticosurrénale de Rat (LEVER 1955) de Hamster (BELT 1960) du foetus humain (ROOS 1962, JOHANNISSON 1968), du Poulet (FUJITA 1961).

Le développement du réticulum endoplasmique lisse est en rapport avec le rôle de certaines enzymes de la biosynthèse des stéroïdes.

FAWCETT, LONG et JONES (1969) ont suggéré que le développement de cet organite n'avait peut-être pas uniquement pour rôle d'augmenter la surface des membranes actives enzymatiquement. Ils ont pensé que la cellule pouvait stocker le cholestérol comme constituant de la couche lipidique de ces membranes. Dans ce cas, le cholestérol précurseur des stéroïdes serait stocké en relation très étroite avec les enzymes qui catalysent sa conversion en stéroïdes (FAWCETT 1965), le développement du réticulum endoplasmique lisse serait alors l'expression de la quantité de cholestérol accumulé.

Le développement du réticulum endoplasmique lisse au 12ème jour pourrait traduire l'intervention de l'ACTH. On sait que l'ACTH stimule la formation du TPNH (NADPH), il intervient donc au niveau de la 21 hydroxylation (réticulum endoplasmique).

Le fait de trouver du réticulum endoplasmique lisse précocement chez l'embryon et de le voir se développer entre le 10ème et le 12ème jour, le fait également qu'il soit impliqué dans la synthèse stéroïdienne (CHRISTENSEN 1965, BJERSING 1967, SAMUELS et UCHIKAWA 1967) prouvent donc que les cellules corticales de la surrénale embryonnaire sont susceptibles d'élaborer très tôt des hormones stéroïdes. De plus nous verrons dans la partie expérimentale de notre travail que les tubules du réticulum endoplasmique lisse se développent après un traitement par l'ACTH. Par ailleurs, KJAERHEIM a montré sa diminution de taille après traitement par les stéroïdes chez la Poule (1968).

La disposition en périphérie autour des gouttelettes lipidiques a également été observée par KJAERHEIM (1968), par LONG et JONES (1967).

Cette localisation illustre le rôle important de cet organite dans la synthèse des stéroïdes.

Inclusion lipidique (liposome)

Il s'agit d'une formation importante de la cellule corticale, en nombre régulièrement croissant des premiers jours d'incubation jusqu'à l'éclosion. Elle apparaît sous différentes formes dont la plus fréquente est représentée par une vésicule claire à périphérie dense située au pôle basal de la cellule. Cet aspect peut-être dû au fait que la plupart des lipides sont solubilisés au cours de la déshydratation et de l'inclusion. C'est cette formation qu'a décrite FUJITA (1961) comme vacuole cytoplasmique ce qui expliquerait la remarque que fait cet auteur de l'absence de gouttelettes lipidiques en microscopie électronique chez l'embryon de Poulet de 15 jours et chez le Poussin. Connaissant la soudanophilie des cellules corticales embryonnaires, il conclut donc que les gouttelettes osmiophiles ne représentent pas les lipides impliqués dans les hormones surrénaliennes. Au pôle apical de la cellule les liposomes sont de plus petite taille, denses aux électrons, ou multivacuolaires.

La formation des liposomes a été un sujet d'investigation fréquent. Il a été rapporté que les mitochondries se transformeraient en gouttelettes lipidiques dans le cortex surrénal (LEVER 1955, 1956, BRAUNSTEINER, FELLINGER et PAKESCH 1955), mais d'autres auteurs n'ont pas approuvé cette donnée. BELT (1958) a avancé que dans la surrénale de Rat les liposomes pouvaient provenir des "microbodies". PALADE (1955) a suggéré le premier que le réticulum agranulaire pouvait être impliqué dans la synthèse lipidique.

Pour Fujita (1961) les lipides corticaux impliqués dans les hormones stéroïdiennes sont produits dans des vacuoles cytoplasmiques considérées comme appartenant au réticulum endoplasmique. Il remarque également que les mitochondries jouent certainement un rôle dans leur élaboration puisqu'elles sont habituellement situées près des enclaves lipidiques. Pour cet auteur, les gouttelettes lipidiques sont élaborées par les mitochondries, et accumulées dans des vacuoles cytoplasmiques.

Au sujet de la libération des produits lipidiques élaborés, nous n'avons jamais observé d'inclusions lipidiques quitter la cellule [BELT, SHERIDAN, KNOUFF et HARTMAN (1965), RHODIN (1970)] ni de fragments cellulaires s'engager entre les cellules endothéliales d'un capillaire sanguin. Ce phénomène qui se produit le plus souvent dans des cellules de la rétículo en dégénérescence a été interprété comme traduisant une sécrétion holocrine (COTTE et COTTE 1961) mais dès 1959 ZELANDER considérait que les fragments cellulaires situés dans les capillaires étaient le résultat d'une mauvaise fixation.

Les auteurs utilisant des fixations par perfusion n'observent pas de protrusions de cellules corticales entre les cellules endothéliales, ce qui laisse donc supposer que ces images sont des artéfacts produits lors du prélèvement et de la fixation.

Corps denses et corps complexes

Nous avons vu également que chez les embryons en fin d'incubation et chez le Poussin, les cellules corticales renferment au pôle apical de petits corps denses homogènes, des corps complexes dont la structure ressemble parfois à celle de l'inclusion lipidique, ils peuvent contenir des figures myéliniques, ou être constitués d'un matériel finement granulaire. Les dénominations sont différentes suivant les auteurs : pigment bodies (ZELANDER 1959) cytosomes (SCHWARZ 1962) liposomes complexes (IDELMAN 1966) lysosomes ou lipofuscin granules (BARGMAN 1967).

Certains auteurs ont suggéré que les gouttelettes lipidiques se transformaient en corps complexes. KJAERHEIM (1968) sur les bases morphologiques de structures intermédiaires entre gouttelettes lipidiques et corps denses a émis l'hypothèse d'une action lysosomiale sur les gouttelettes lipidiques.

On a également cherché à connaître la signification et le rôle de ces corps complexes, IDELMAN (1966), PENNEY et BARNETT (1965), SZABO, STARK et VARGA (1967) ont mis en évidence une activité phosphatasique acide à leur niveau. Cette propriété hydrolytique les apparenterait donc aux lysosomes.

L'ergastoplasme (réticulum endoplasmique granulaire)

Nous avons vu qu'il est présent dès le 6ème jour d'incubation, qu'il se trouve fréquemment autour des mitochondries, et que cet organite acquiert un développement discret dans la cellule corticale ; en effet, en fin d'incubation ses éléments ne sont pas très nombreux. Il a pourtant été signalé comme existant en grandes quantités dans le cortex surrénal humain (LONG et JONES 1967) mais KJAERHEIM (1968) a également souligné sa pauvreté dans les cellules corticales de la Poule.

Les ribosomes

Leur abondance est un caractère commun au cortex surrénal de toutes les espèces. On connaît leur richesse en ARN indispensable à la synthèse protéique de la cellule.

Les filaments cytoplasmiques

Les filaments cytoplasmiques ont également été signalés dans d'autres cellules qui élaborent des stéroïdes (cellules interstitielles du testicule FAWCETT 1966), ils auraient un rôle de soutien cellulaire.

Les microtubules

Les microtubules ne sont pas habituels dans les cellules stéroïdiennes, la seule observation qui en fait mention est celle de KJAERHEIM chez la Poule.

Leur présence a été remarquée dans d'autres cellules où on leur a attribué des rôles variés. Leur morphologie est semblable à celle des fibrilles des figures mitotiques (KANE 1962) ; on a pensé qu'ils avaient un rôle de soutien de la cellule, qu'ils servaient de voie de migration à un produit de sécrétion situé dans des vésicules extérieures aux tubules (LENTZ 1967), qu'ils avaient un rôle cytophysiologique dans un transport enzymatique, ou de produits élaborés (JOURNEY 1964).

Les cils

Ils sont souvent rencontrés dans les glandes endocrines.

Appareil de Golgi

Il est présent dès le 7ème jour et se développe à partir du 10ème jour. Au cours d'expérimentations il répond à la stimulation en augmentant de taille. ce qui confirme son rôle dans le processus d'élaboration.

En résumé, en réunissant les résultats obtenus sur la mise en place et l'évolution des organites, nous pouvons conclure que :

- tous les organites impliqués dans la synthèse des stéroïdes sont en place au 6ème jour d'incubation.

- leur nombre augmente au 10ème jour et leur structure évolue entre les 12ème et 15ème jours.

- entre le 16ème et le 18ème jour d'incubation leurs caractères ultrastructuraux sont semblables à ceux des cellules fonctionnelles adultes (en particulier en ce qui concerne les caractères ultrastructuraux des mitochondries).

Cette seule étude ultrastructurale ne peut suffire à préciser à quel moment de l'organogenèse la glande surrénale élabore des stéroïdes. C'est pourquoi l'étude des caractères histochimiques des cellules corticales est nécessaire avant d'entreprendre une étude expérimentale.

II - CARACTERES HISTOCHIMIQUES

A) - INTRODUCTION

Le tissu corticosurrénalien est caractérisé par une très grande richesse en lipides. Nous avons vu dans le chapitre Historique, que la nature lipidique de ces inclusions étant reconnue et leurs propriétés étudiées (biréfringence, réduction de l'acide osmique, solubilité dans l'acétone) les recherches histochimiques ont été extrêmement nombreuses. Un des premiers résultats a été d'accorder à ces inclusions un rôle important dans la synthèse des stéroïdes alors qu'on les considérait comme des dégénérescences graisseuses. De nombreuses études ont été centrées sur la distribution des lipides neutres, du cholestérol, des phospholipides, de l'acide ascorbique, des phosphatases dans le cortex surrénal des Mammifères. La corticosurrénale embryonnaire a été bien

moins souvent étudiée et les recherches qu'elle a suscitées ont été effectuées surtout chez les Mammifères. Chez l'embryon de Poulet, DAWSON (1953) a cherché à mettre en évidence la différenciation des cellules corticales par certaines réactions (Soudan, biréfringence, réaction de Schultz pour la mise en évidence du cholestérol) et il obtient des réactions positives uniformes à partir des 11ème et 12ème jours d'incubation.

Des investigations cytochimiques du cortex surrénal embryonnaire du Poulet ont été effectuées par SIVARAM (1964-1968) qui a mis en évidence au 10ème jour d'incubation, du cholestérol, de l'acide ascorbique, des lipides neutres et un système enzymatique fondamental de la stéroïdogénèse : le système $\Delta^5 - 3 \beta$ hydroxystéroïdodéhydrogénasique. Il en conclut qu'à partir du 10ème jour, le cortex embryonnaire est engagé dans la sécrétion des hormones stéroïdes. Il apporte également quelques précisions sur le problème de la zonation. Il observe en effet qu'à partir du 15ème jour, apparaissent des différences histochimiques entre une étroite zone périphérique et une large zone centrale. Les cordons corticaux périphériques contenant de plus grandes concentrations en acide ascorbique, en phosphomonoestérase alcaline, en aliés-térase et en cholinestérase que les cordons corticaux centraux, ce qui indiquerait une zonation non seulement morphologique mais fonctionnelle.

ADJOVI (1970) a recherché le moment d'apparition du cholestérol au cours du développement de la glande surrénale chez le Poulet et a observé les premiers cristaux de cholestérol libre entre 10 jours et 11 jours d'incubation.

L'auteur observe également au 15ème jour une localisation préférentielle des cristaux à la périphérie de la glande.

Au cours de nos observations en microscopie électronique, nous avons décelé dès le 6ème jour d'incubation la présence de gouttelettes lipidiques dans les cellules des ébauches corticales. Nous avons donc essayé de préciser la nature histochimique de ces inclusions.

Dans un premier temps nous avons effectué nos réactions sur du matériel formolé coupé à congélation. (fixation formol à 10% au formol calcium de Baker. Inclusion dans la gélatine. Coupes au microtome à congélation). Nous n'avons pas obtenu de résultats valables et réguliers. La nature des inclusions observées au niveau ultrastructural restait inconnue. L'utilisation de matériel frais congelé à $- 20^{\circ}$ et coupé au cryostat a permis d'obtenir de meilleures coupes, de meilleurs résultats et des réactions positives dès le 7ème jour.

en particulier les recherches de cholestérol et de $\Delta^5 - 3 \beta$ HSDH adaptées aux coupes au cryostat ont fourni des résultats positifs plus précocement que par les autres techniques.

L'étude histochimique de la corticosurrénale embryonnaire a donc consisté à mettre en évidence certains constituants de la cellule corticale :

- les lipides
- l'acide ascorbique
- la $\Delta^5 - 3 \beta$ hydroxystéroïdodeshydrogénase

B) - ANALYSE DES INCLUSIONS LIPIDIQUES

Après avoir révélé la nature lipidique des inclusions présentes dans les cellules corticales par des lysochromes (noir Soudan B, bleu BZL, Oil Red O), nous avons recherché plus particulièrement la présence des phospholipides, des plasmalogènes et du cholestérol.

1°) - LIPIDES EN GENERAL

Nous avons utilisé au début de nos recherches les lysochromes rouge Soudan III et IV qui colorent les lipides en rouge-orangé mais nous les avons rapidement abandonnés au profit du noir Soudan B qui ne provoque ni images empâtées ni artéfacts.

Par le noir Soudan B les inclusions lipidiques sont colorées en bleu noir, nous avons observé les premières gouttelettes dans les glandes surrénales d'embryons de 8 jours. A partir du 12ème jour, on voit nettement se dessiner une localisation préférentielle des inclusions lipidiques à la périphérie des cordons corticaux. Ceux-ci apparaissent alors cernés par une mince bande de matériel soudanophile. Les cellules corticales s'enrichissent en matériel lipidique au cours du développement et les colorations deviennent plus intenses.

2°) - LIPIDES NEUTRES (Glycérides)

a) - Le bleu BZL (MERCK) qui doit colorer les lipides figurés en bleu foncé ne nous a pas donné de résultats satisfaisants.

b) - L'Oil Red O en solution dans l'isopropanol nous a fourni de très bons résultats (Planche VII). Les images obtenues sont très précises, les plus fines gouttelettes lipidiques sont colorées en rouge vif.

Les glycérides révélés par l'Oil Red O sont observés dans l'ébauche corticale au 6ème jour d'incubation. A ce stade et jusqu'au 9ème jour, les inclusions lipidiques sont peu nombreuses ; à partir du 9ème jour, on reconnaît la polarité des cellules corticales déjà observée mais plus tardivement par les autres techniques de coloration (12ème jour).

Les inclusions lipidiques sont situées en périphérie de chaque cordon cortical mais à partir du 10ème jour on distingue également de fines gouttelettes au pôle apical des cellules. Le nombre des inclusions colorables par l'Oil Red O s'accroît régulièrement au cours du développement et en fin d'incubation les colorations sont très intenses dans tous les cordons. (Planche VII Figure 25).

c) - Le Fettrot 7 B (CIBA) colore les lipides neutres en rouge mais moins intensément que l'Oil Red O, les résultats obtenus (stade d'apparition, évolution) sont semblables dans les deux techniques. Par contre, le Fettrot 7 B (GURR) ne nous a fourni que de faibles colorations de notre matériel.

3°) - DISTINCTION ENTRE LIPIDES ACIDES ET LIPIDES NEUTRES PAR LE SULFATE DE BLEU DE NIL (CAIN 1947)

Des gouttelettes lipidiques colorées en rose sont détectées au 8ème jour d'incubation, dans les cordons périphériques et centraux. Au 10ème jour elles occupent la partie basale des cellules. Des inclusions colorées en bleu foncé apparaissent également dès le 8ème jour, elles sont disséminées dans tout le cytoplasme, leur nombre croît rapidement et est toujours supérieur à celui des gouttelettes colorées en rose. Au 18ème jour la coloration rose n'est visible que dans les cellules des cordons périphériques.

Selon CAIN (1947), les corps gras neutres, (essentiellement les esters du glycérol et du cholestérol) sont colorés en rose. Cette coloration est due au constituant oxazone (rouge de Nil) du colorant, mais cette teinte est souvent masquée par la coloration bleue que donne le colorant oxazine (bleu de Nil) à

PLANCHE VII

PLANCHE VII

Mise en évidence des lipides neutres (glycérides). Coupe au cryostat.
Coloration Oil Red O en solution dans l'isopropanol.

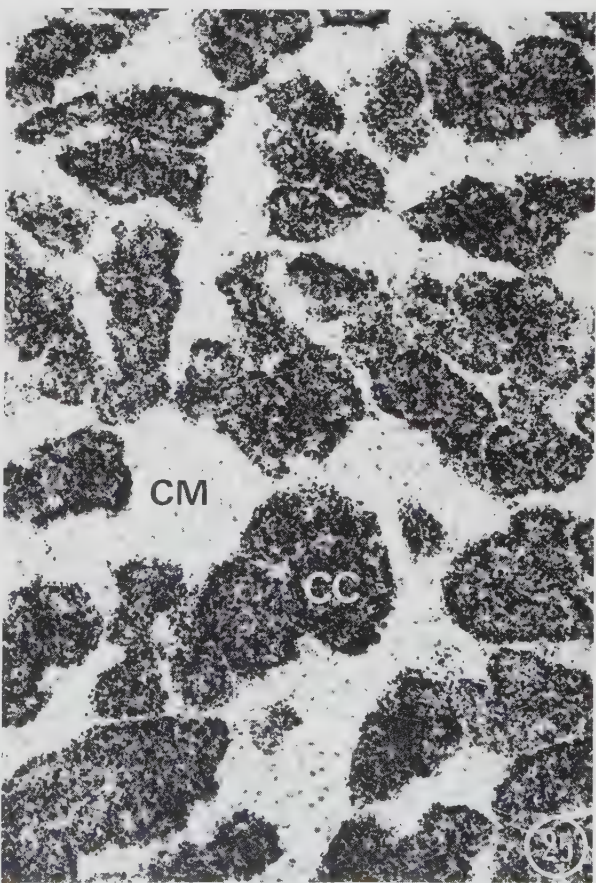
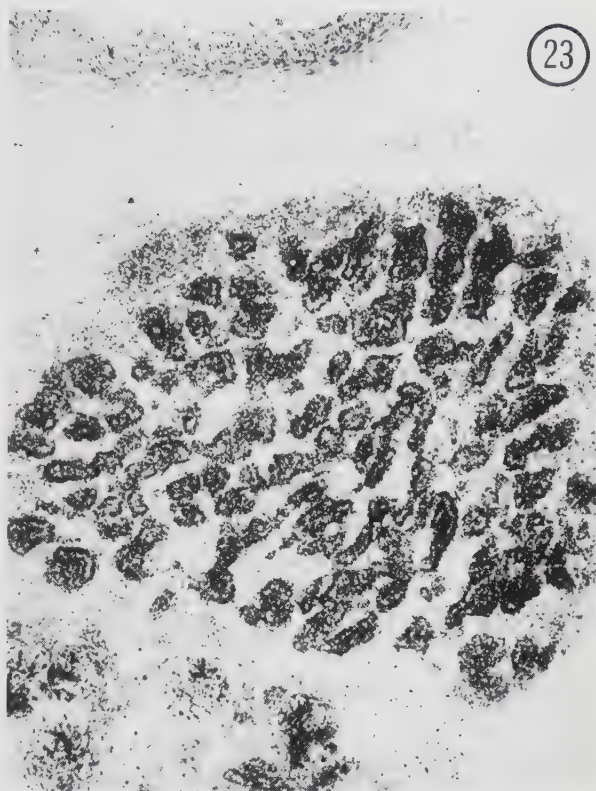
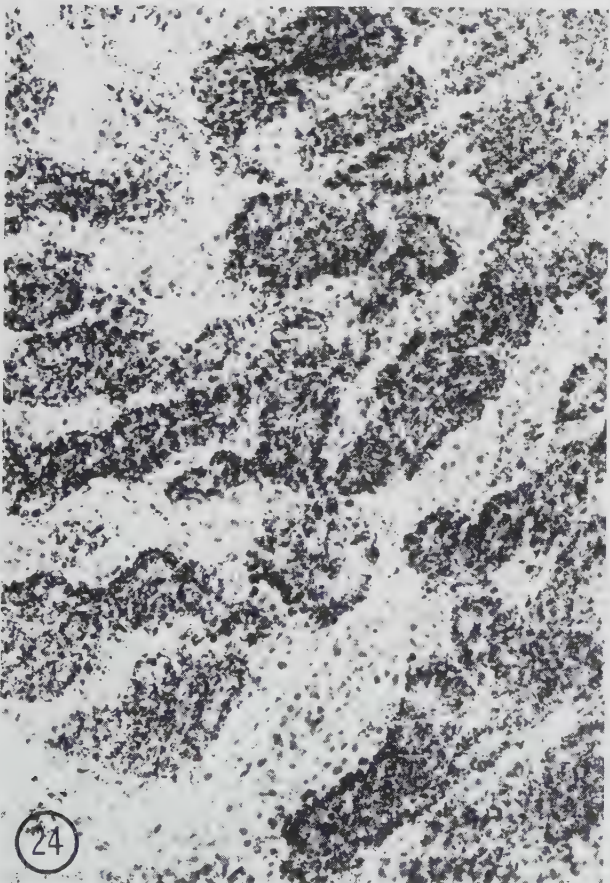
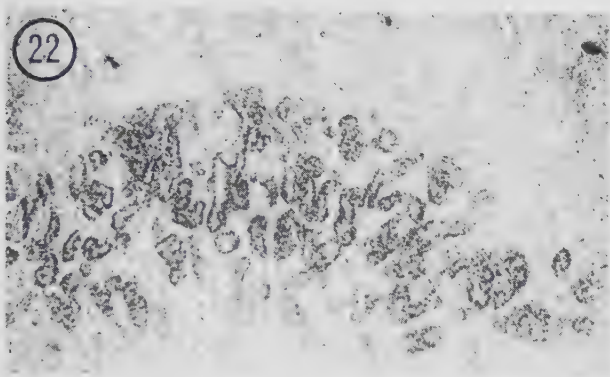
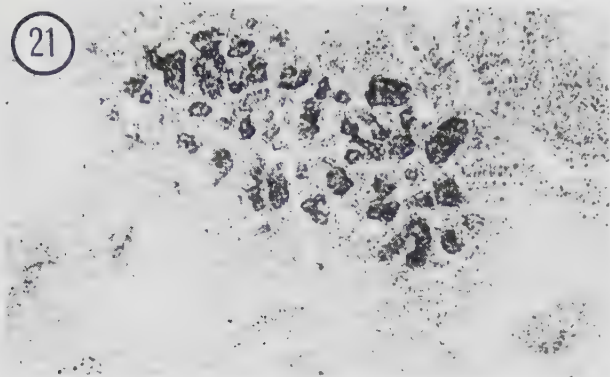
Figure 21 : Embryon 10 jours d'incubation. Dès ce stade la majeure partie des inclusions lipidiques est disposée en périphérie des cordons corticaux (pôle basal des cellules) (x 63)

Figure 22 : Embryon 11 jours d'incubation.
Les cordons corticaux se sont multipliés et ont augmenté de taille.
(x 63)

Figure 23 : Embryon 16 jours d'incubation.
On note l'augmentation de l'intensité de la réaction. (x 63)

Figure 24 : Embryon 14 jours d'incubation.
La microphotographie est destinée à montrer la localisation des inclusions lipidiques dans les cordons corticaux. De nombreuses inclusions déterminent un liseré très dense à la périphérie ; de très fines gouttelettes emplissent la totalité du cordon cortical.
(x 160)

Figure 25 : Poussin 3 jours. Les cordons corticaux sont bien individualisés et montrent une très grande richesse en lipides.
CC : cordon cortical ; CM : cellules médullaires. (x 160)



diverses structures basophiles et aux phospholipides (corps gras acides). Les lipides colorés en bleu n'ont donc aucune spécificité histochimique. LISON (1960) a également fait remarquer que tous les phospholipides ne sont pas acides, l'absence de coloration n'a donc pas de signification, seule la coloration rose traduit la présence de glycérides neutres.

4°) - LES PHOSPHOLIPIDES

a) - Technique de "Postchromisation contrôlée" d'ELFTMAN (1954)

La technique originale comportait deux temps : une première fixation dans une solution à 1% d'acide osmique dans du tampon véronal sodique M/40 pH 7,2 à 5°C pendant 5 à 7 heures et après rinçage, une postchromisation de 18 heures à 56°C par une solution de bichromate de potassium à 5% dans du tampon acétate M/5 pH 3,5.

Le bichromate de potassium stabilise les lipides, certains lipides fixent du chrome qui sera révélé ultérieurement par l'hématéine acide, sous forme d'une laque chromique d'hématéine. De plus, les lipides deviennent insolubles dans les liposolvants ce qui permet de réaliser une inclusion à la paraffine.

- Coloration par l'hématéine acide

Au 7ème jour d'incubation de petits granules bleu noir sont visibles dans toutes les cellules corticales. Leur nombre augmente et au 12ème jour, ils sont situés principalement en périphérie des cordons corticaux. Ultérieurement (14ème jour) on les observe également au centre des cordons. Ils apparaissent donc à la partie basale puis à la partie apicale de la cellule. Cette technique révèle également des structures colorées en bleu noir au niveau des cellules médullaires. Ces structures disparaissent après un traitement par la pyridine, elles sont donc bien de nature phospholipidique. Nous verrons ultérieurement qu'elles correspondent au support des grains de catécholamines.

- Coloration par le noir Soudan B

Certaines coupes voisines des précédentes au lieu d'être colorées par l'hématéine acide, sont colorées par le noir Soudan B. Sur ces lames, à tous les stades le matériel lipidique coloré est plus important que celui coloré par l'hématéine, notamment en périphérie de chaque cordon cortical. (Planche VIII Figure 27)

PLANCHE VIII

PLANCHE VIII

Figure 26 : Embryon 18 jours d'incubation.

Fixation Elftman destinée à insolubiliser les lipides. Coloration noir Soudan B.

Cette technique confirme la disposition des enclaves lipidiques en périphérie des cordons corticaux. (x 100)

Figure 27 : Embryon 16 jours d'incubation.

Fixation Elftman. Coloration noir Soudan B.

On observe la répartition du matériel lipidique dans les cordons corticaux : grosses enclaves lipidiques au pôle basal des cellules et fines inclusions au pôle apical.

CC : cordon cortical. (x 160)

Figure 28 : Embryon 10 jours d'incubation.

Mise en évidence de l'acide ascorbique sur pièces. Coupe à la paraffine. Coloration safranine.

On observe très distinctement un précipité d'argent sur les cordons corticaux.

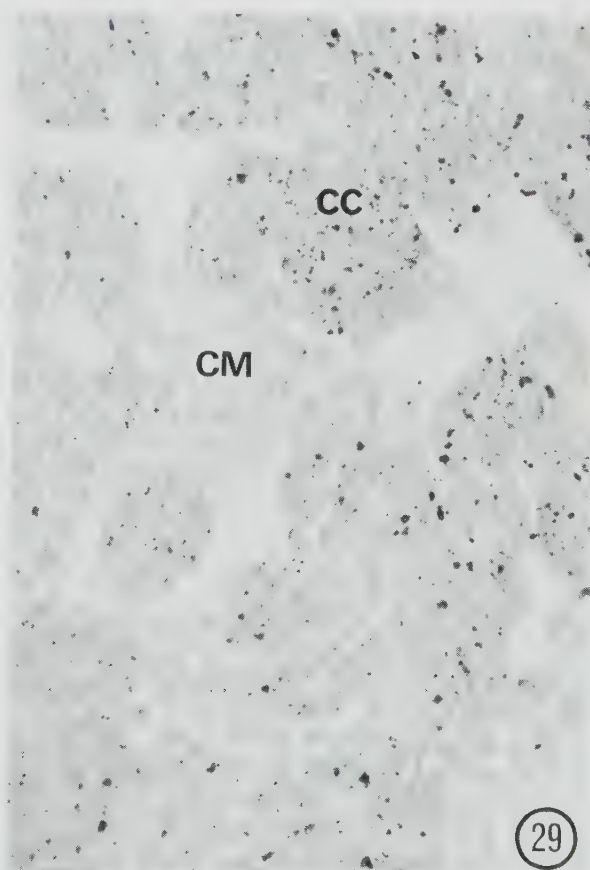
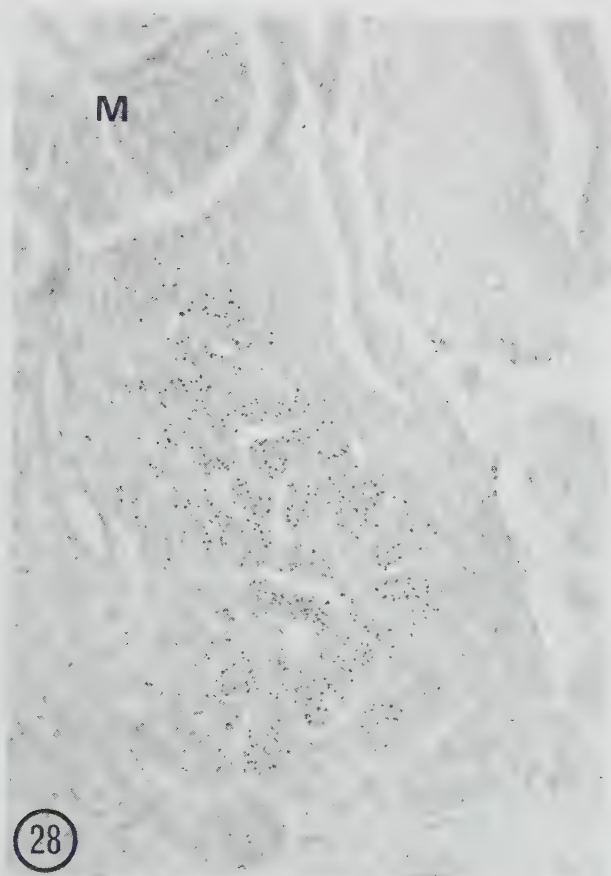
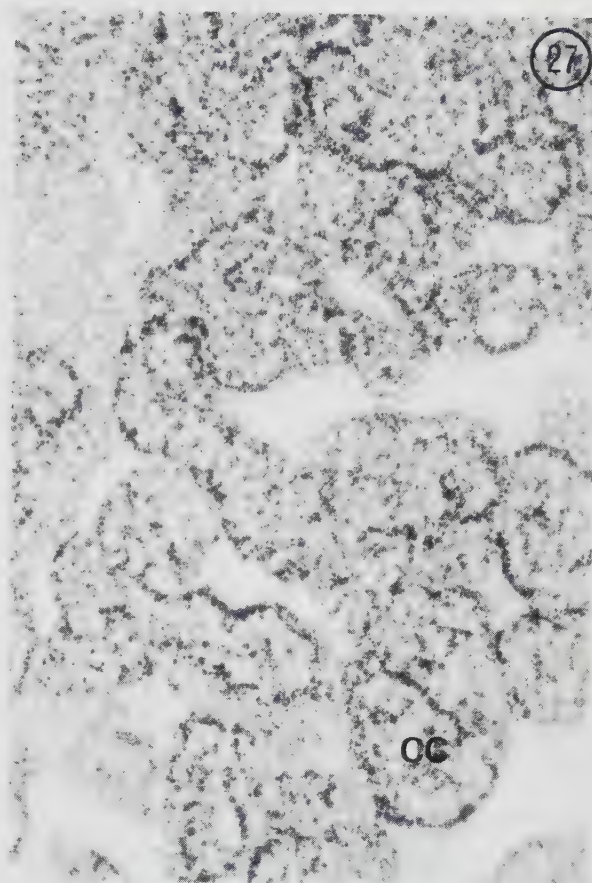
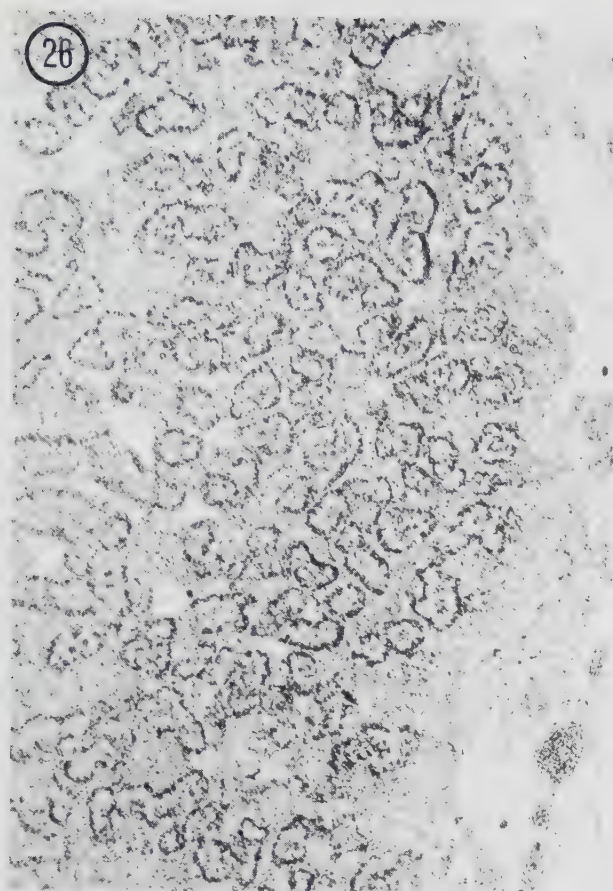
M : mésonephros. (x 100)

Figure 29 : Embryon 17 jours d'incubation.

Mise en évidence de l'acide ascorbique sur pièces. Coupe à la paraffine. Coloration safranine.

La quantité de précipité d'argent est variable suivant les cordons corticaux. (cf. texte)

CC : cordon cortical ; CM : cellules médullaires. (x 250)



Dans les deux cas, (hématéine-noirSoudan B) les lipides qui ont fixé du chrome (phospholipides) sont colorés, tandis que les lipides qui n'ont pas fixé de chrome sont colorés uniquement par le noir Soudan B.

b) - Luxol Fast Blue (E. GURR)

Ce colorant ne nous a pas donné de résultats valables : le cytoplasme de toutes les cellules est coloré en bleu. On y distingue difficilement des granules bleu vif. Les images obtenues sont de mauvaise qualité et nous ont amené à abandonner cette technique.

5°) - LES PLASMALOGENES

Ils diffèrent chimiquement des phospholipides par le fait que leur hydrolyse libère non pas des acides gras mais des aldéhydes. Ils sont décelés par la réaction plasmale de FEULGEN et VOIT (1924) obligatoirement effectuée sur du tissu frais coupé à congélation. Cette technique comporte l'action rapide du chlorure mercurique qui provoque une hydrolyse des plasmalogènes libérant des aldéhydes détectés par le réactif de SCHIFF.

Nous avons recherché cette réaction plasmale selon la technique de HAYES (1949).

Elle se traduit lorsqu'elle est positive par l'apparition d'une coloration rose diffuse dans le cytoplasme de toutes les cellules corticales. Les plasmalogènes sont mis en évidence chez des embryons de 9 jours et leur présence est observée tout au long du développement.

6°) - BIREFRINGENCE

Nous avons examiné en lumière polarisée des coupes au cryostat de tissu frais ou fixé au formol et montées à la glycérine pour l'observation de cristaux biréfringents.

C'est dès le 7ème jour que nous avons observé des cristaux biréfringents se présentant sous forme d'aiguilles enchevêtrées. Cet aspect résulte de l'action du fixateur et du froid. Ces cristaux disparaissent lorsqu'on chauffe la lame et réapparaissent au refroidissement sous forme :

- de cristaux qui présentent quatre positions d'extinction mais qui

ne donnent pas de croix de polarisation.

- de gouttelettes s'illuminant entre nicols croisés avec une croix noire de polarisation.

Dans le premier cas nous ne pouvons rien conclure sur la composition chimique de ces lipides car tous les corps gras (glycérides, acides gras, cholestérides) peuvent se présenter sous cette forme ; dans le second cas (croix noire de polarisation) nous sommes en présence de cholestérides ou de phospholipides.

Ces gouttelettes biréfringentes très nombreuses (Planche X Figures 36 et 38) ont une localisation semblable à celle des inclusions lipidiques mises en évidence par l'Oil Red O.

7°) - LE CHOLESTEROL

Nous avons mis en évidence cette substance, précurseur des hormones stéroïdes, par la réaction à la digitonine de WINDAUS (variante de LISON 1936) qui est effectuée sur du tissu frais coupé au cryostat.

Le cholestérol libre donne avec la digitonine un complexe cristallisé insoluble dans l'eau et dans l'alcool. Les coupes sont observées en lumière polarisée entre nicols croisés. Le complexe cholestérol-digitonine se traduit par l'apparition de cristaux en aiguilles ou en rosettes.

Certaines coupes après passage dans la solution de digitonine sont colorées par le noir Soudan B qui colore les esters du cholestérol et supprime ainsi leur biréfringence, le complexe cholestérol-digitonine ne se colore pas et reste biréfringent.

Nous avons détecté les premiers cristaux du complexe cholestérol-digitonine dans la glande surrénale des embryons de 8 jours.

La quantité de cristaux augmente régulièrement traduisant ainsi l'augmentation progressive de la concentration en cholestérol de la corticosurrénale (Planche IX Figures 30 à 34, Planche X Figures 35 et 37). Ces inclusions sont observées aussi bien dans les cordons périphériques que dans les cordons centraux. A partir du 16ème jour d'incubation, de nombreux cristaux du complexe cholestérol-digitonine semblent localisés à la périphérie des cordons corticaux, cette disposition est surtout visible au centre de la glande (Planche X Figure 37).

PLANCHE IX

PLANCHE IX

Mise en évidence du cholestérol par la réaction à la digitonine de Windaus.
Coupe au cryostat. Observation des cristaux du complexe cholestérol-digitonine en lumière polarisée.

Figure 30 : Embryon 8 jours d'incubation.

A ce stade on observe les premiers cristaux du complexe cholestérol-digitonine. (x 160)

Au cours des 9ème, 10ème, 12ème et 14ème jours d'incubation, on observe une augmentation régulière du nombre de cristaux du complexe cholestérol-digitonine. Figure 31 (x 160) ; Figure 32 (x 160) ; Figure 33 (x 63) ; Figure 34 (x 63)

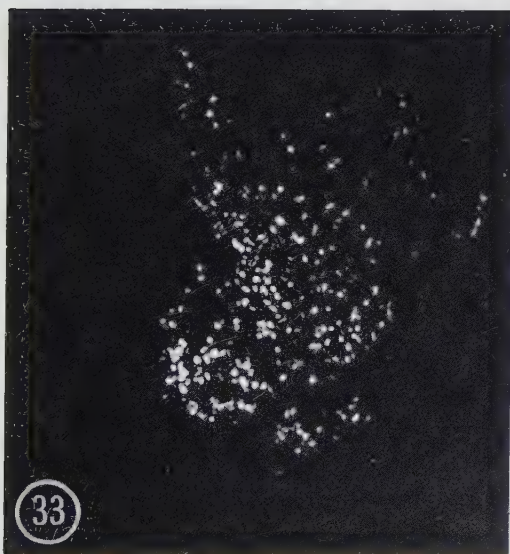
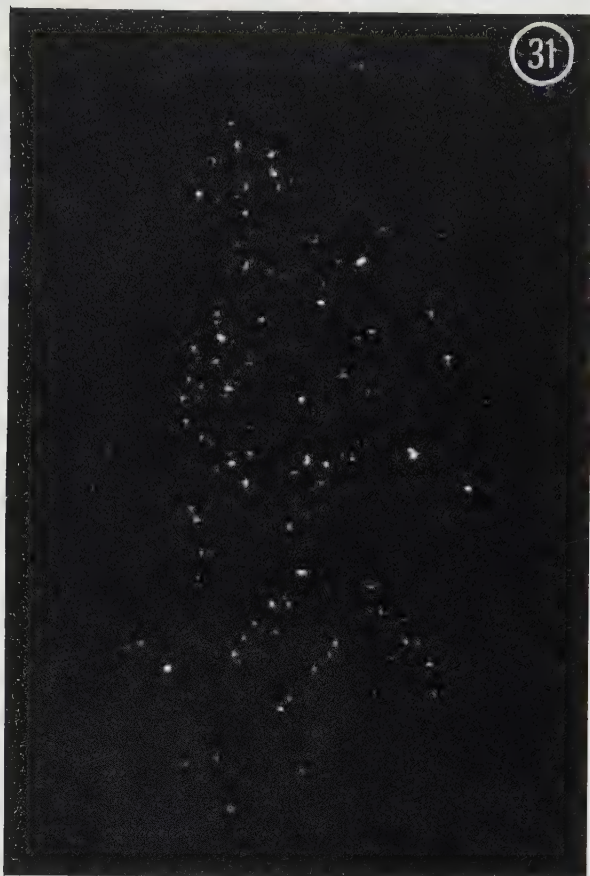


PLANCHE X

PLANCHE X

Ces photographies sont destinées à montrer la proportion de cristaux de cholestérol-digitonine par rapport à la totalité des lipides biréfringents.

A gauche : Coupe au cryostat. Réaction à la digitonine. Examen en lumière polarisée des cristaux du complexe cholestérol-digitonine.

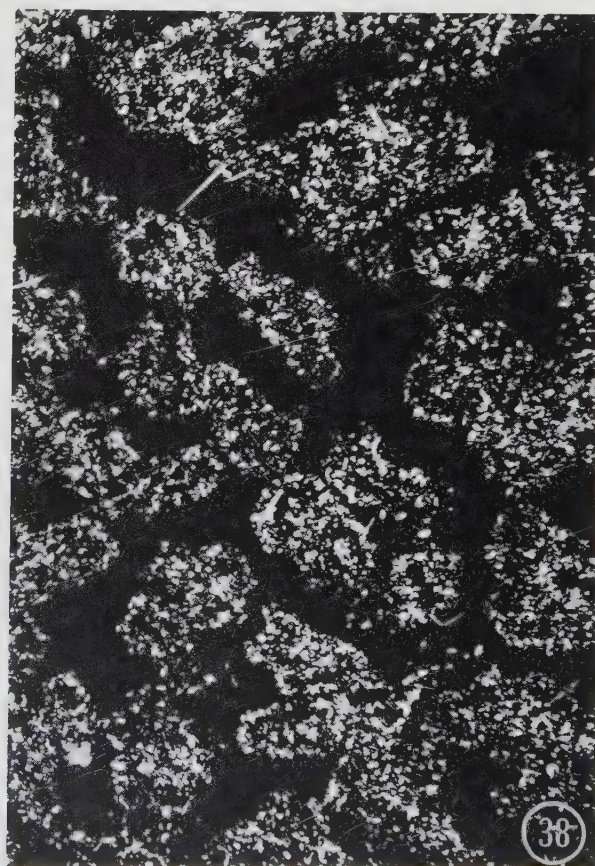
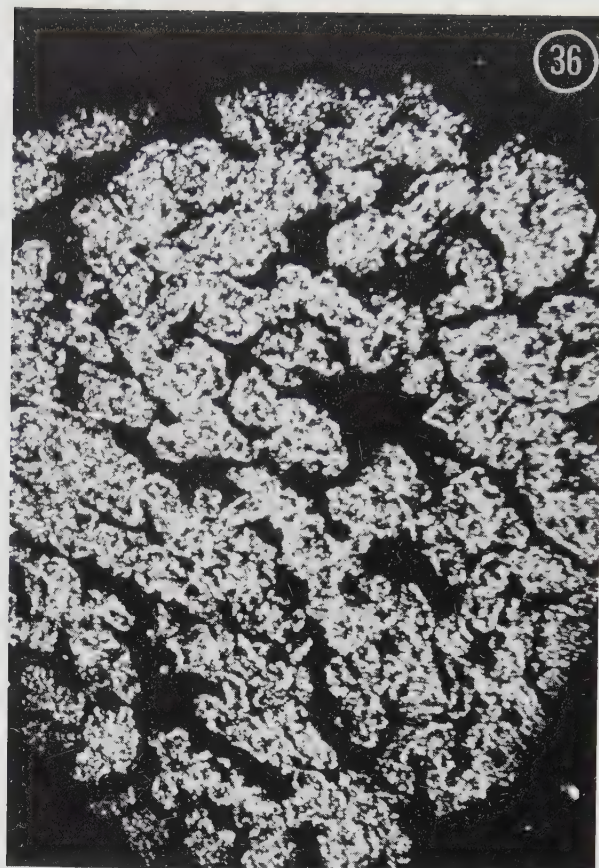
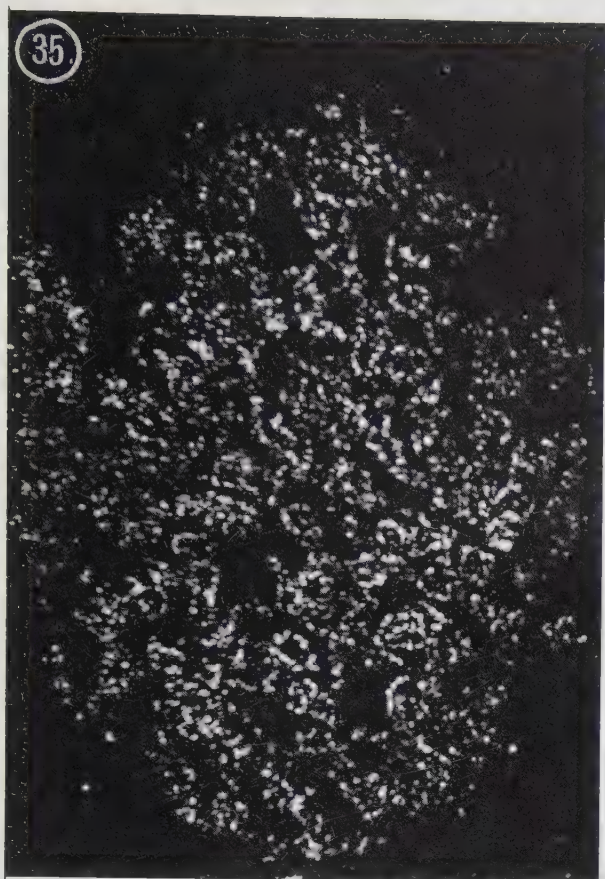
Figure 35 : Embryon 16 jours d'incubation. Le nombre de cristaux de cholestérol-digitonine s'est considérablement accru. (cf. Figure 34) (x 63)

Figure 37 : Embryon 20 jours d'incubation. (x 160)

A droite : Coupe au cryostat. Examen en lumière polarisée des lipides biréfringents.

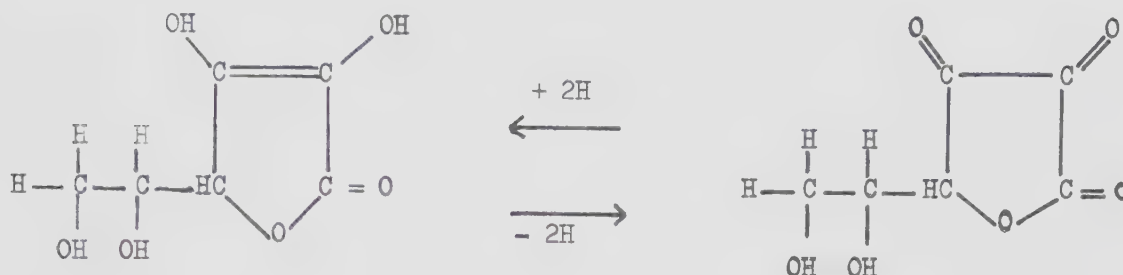
Figure 36 : Embryon 16 jours d'incubation. (x 63)

Figure 38 : Embryon 20 jours d'incubation. (x 160)



C) - DETECTION DE L'ACIDE ASCORBIQUE

L'acide ascorbique est un puissant réducteur, il s'oxyde facilement et donne en perdant 2 atomes d'hydrogène l'acide déhydro-ascorbique. Cette réaction est réversible.



ACIDE ASCORBIQUE

ACIDE DEHYDROASCORBIQUE

L'acide ascorbique a dans l'organisme un rôle essentiel de transporteur d'hydrogène et intervient à ce titre dans les processus d'oxydo-réduction.

La corticosurrénale des Mammifères contient des quantités importantes d'acide ascorbique (SZENT-GYORGYI 1932). Le taux de cette substance varie dans certains cas expérimentaux, ce qui prouve bien son rôle dans la physiologie de la cellule corticale, nous avons donc recherché sa présence dans la corticosurrénale embryonnaire.

Dans la technique de BACCHUS (1950) les pièces de tissu frais sont plongées dans une solution de nitrate d'argent acidifiée par de l'acide acétique (GIROUD et LEBLOND 1934). Le nitrate d'argent est réduit par de l'acide ascorbique et l'excès est éliminé par de l'hyposulfite, toutes ces opérations se faisant à l'obscurité, mais l'hyposulfite réagit in vitro avec le nitrate d'argent pour donner un précipité blanc qui noircit ultérieurement, ce qui provoque des artéfacts. SOSA (1948) a donc fait précéder le traitement à l'hyposulfite d'un passage de la pièce dans une solution de sulfite de sodium, ce qui permet d'éviter ces artéfacts et d'effectuer la suite des opérations à la lumière du jour. De nombreuses critiques ont été émises et de nombreux arguments ont été présentés

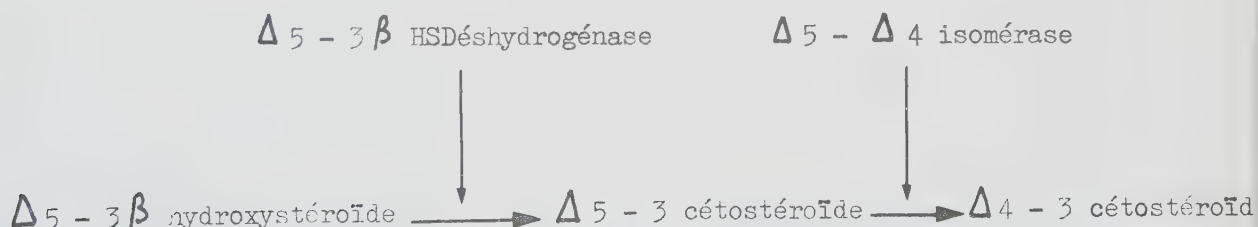
pour justifier de la valeur de cette réaction. LISON (1960) après avoir rassemblé les arguments chimiques et physiologiques conclut à la valeur spécifique de la réaction.

La recherche de cette substance sur coupes au cryostat plongées directement dans la solution de nitrate d'argent acidifié réduit évidemment les artéfacts dûs à la diffusion de la vitamine C.

La réaction positive se traduit par un précipité d'argent réduit. L'acide ascorbique est détecté au 9ème jour d'incubation, mais le précipité d'argent réduit, a une localisation intracellulaire imprécise. Du 9ème au 12ème jour, certains cordons corticaux sont recouverts d'un précipité d'argent et d'autres en sont presque dépourvus (Planche VIII Figures 28 et 29). Dans les stades ultérieurs, tous les cordons sont marqués d'un précipité dont la densité est la même en périphérie qu'au centre. En fin d'incubation et chez les Poussins il est surtout situé au pôle apical des cellules corticales. Cette disposition est nettement visible dans les cordons corticaux du centre de la glande.

D) - DETECTION DE L'ACTIVITE $\Delta 5 - 3 \beta$ HYDROXYSTEROÏDODÉSHYDROGENASIQUE

Une des premières étapes de la synthèse des hormones stéroïdes est la transformation des $\Delta 5 - 3 \beta$ hydroxystéroïdes en $\Delta 4 - 3$ céto-stéroïdes. Cette oxydation est catalysée par une $\Delta 5 - 3 \beta$ hydroxystéroïdodéshydrogénase qui permet le transfert d'atomes d'hydrogène sur un coenzyme, le NAD (nicotinamide adénine dinucléotide). Cette réaction est couplée avec une isomérase : $\Delta 5 - \Delta 4$ isomérase.



De très nombreux travaux ont montré la présence de cette enzyme dans différents tissus produisant des stéroïdes (testicule, ovaire, placenta, cortex

PLANCHE XI

PLANCHE XI

ise en évidence de l'activité $\Delta^5 - 3\beta$ hydroxystéroïdodeshydrogénasique.
Coupe au cryostat. Substrat : déhydroépiandrosterone.

Figure 39 : Embryon 5 jours d'incubation. Coupe longitudinale. Dès ce stade cette activité enzymatique est décelée au niveau de l'ébauche corticale (EC) sous forme d'un précipité extrêmement fin de formazan. (x 160)

Figure 40 : Embryon 6 jours d'incubation. Coupe longitudinale passant par les deux ébauches corticales. Le précipité de formazan est plus abondant qu'au stade précédent. L'inégalité de l'intensité de la réaction dans les deux ébauches corticales est due à une irrégularité de la coupe. (x 63)

Figure 41 : Embryon 9 jours d'incubation. (x 63)

Figure 42 : Embryon 11 jours d'incubation. L'activité enzymatique est présente dans tous les cordons corticaux. (x 63)

Figure 43 : Embryon 16 jours d'incubation. (x 63)

Figure 44 : Poussin 1 jour. L'activité enzymatique dont l'augmentation a été régulière tout au long du développement, présente à l'éclosion une intensité très grande et égale dans tous les cordons corticaux. (x 63)

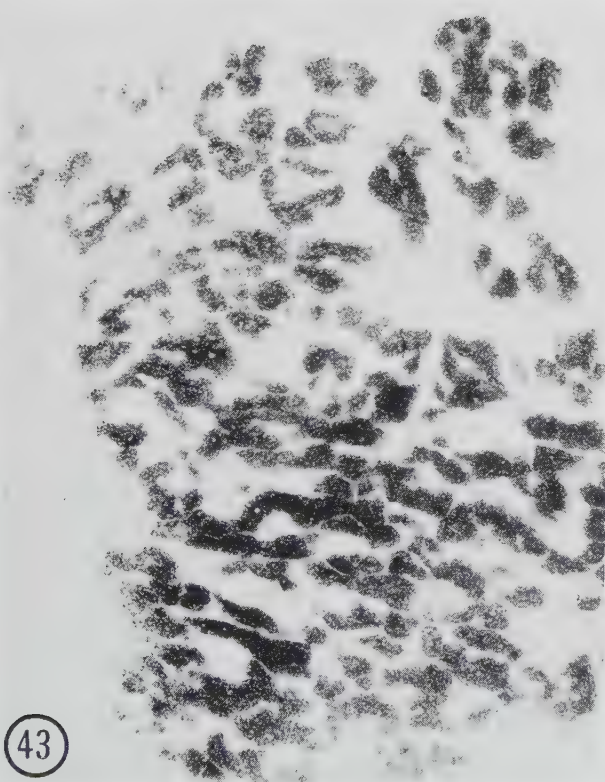
39

Ec

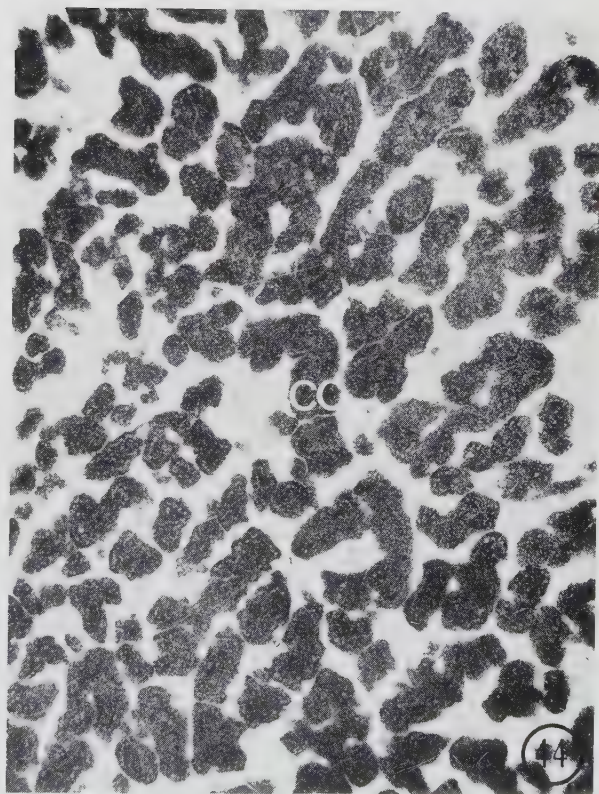
40

41

42



43



44

surrénal). Dans la glande surrénale des Mammifères, cette activité enzymatique a été souvent recherchée et étudiée en fonction de conditions expérimentales (après traitement hormonal ou hypophysectomie).

Il existe peu de travaux sur le moment d'apparition de cette activité enzymatique dans la corticosurrénale embryonnaire. Chez l'embryon de Poulet, SIVARAM (1969) l'a mise en évidence au 10ème jour d'incubation.

Nous avons décelé une activité $\Delta 5 - 3 \beta$ hydroxystéroïdodéshydrogénasique au niveau de l'ébauche corticale dès le 5ème jour de l'incubation (Planche XI Figure 39). A ce stade, les ébauches corticales forment des masses compactes dans le mésenchyme entre l'aorte et le mésonephros, et les cellules médullaires ne se sont pas encore infiltrées entre les îlots corticaux.

Cette activité s'accroît très régulièrement au cours du développement et le précipité de formazan devient très dense au niveau de tous les cordons corticaux. A partir du 18ème jour, le dépôt de formazan est si dense que les cordons semblent uniformément bleu noir.

E) - DISCUSSION

Nos résultats concernant l'ordre chronologique d'apparition des constituants peuvent être résumés ainsi :

- 5ème jour : Activité $\Delta 5 - 3 \beta$ hydroxystéroïdodéshydrogénasique.
- 6ème jour : Lipides neutres (glycérides).
- 7ème jour : Phospholipides.
- 8ème jour : Cholestérol.
- 9ème jour : Acide ascorbique - Plasmalogènes.

La présence de la $\Delta 5 - 3 \beta$ HSD est un argument en faveur de l'aptitude d'élaboration des stéroïdes par la corticosurrénale embryonnaire, mais cela ne signifie pas que dès le 5ème jour, la glande synthétise des stéroïdes.

Notre observation est en accord avec celles de CHIEFFI et Coll. (1964), BOUCEK et Coll. (1966) mais SIVARAM (1969) n'avait noté l'apparition de l'activité $\Delta 5 - 3 \beta$ hydroxystéroïdodéshydrogénasique qu'au 10ème jour.

Cet auteur avait également conclu que les principaux constituants impliqués dans le fonctionnement du cortex surrénal (en particulier cholestérol et activité $\Delta 5 - 3 \beta$ hydroxystéroïdodéshydrogénasique) sont présents au

10ème jour, mais il avait recherché ces composants sur du matériel formolé et coupé à la congélation.

Nous avons également au début de notre étude histochimique obtenu ces résultats en ce qui concerne les lipides, en utilisant la même technique (matériel formolé, coupé à la congélation).

Etant donné que nous avons observé en microscopie électronique des inclusions lipidiques dans les cellules corticales d'embryons de 6 jours et que nous n'obtenions pas de résultats histochimiques positifs avant le 10ème jour, nos résultats morphologiques et histologiques n'étaient pas en concordance. Il est certain que dans ces stades embryonnaires, la concentration en matériel lipidique, en cholestérol est infime et que nous sommes limités techniquement pour les mettre en évidence. Aussi nous avons essayé de rechercher ces constituants sur du matériel congelé à - 20° et coupé au cryostat.

Nous avons ainsi identifié des lipides au 6ème jour et du cholestérol dans les surrénales embryonnaires au 8ème jour, alors qu'ADJOVI (1970) n'a trouvé cette substance qu'au 10ème jour d'incubation.

La mise en évidence de l'acide ascorbique se traduit par un précipité d'argent réduit ; si la localisation intracellulaire est imprécise, sa présence dans les cellules corticales au 9ème jour est un résultat certain et valable.

L'acide ascorbique a non seulement un rôle de transporteur d'hydrogène mais il pourrait également jouer un rôle dans le processus d'élaboration, en effet KIRSTEN et Coll. (1955-1958) ont montré qu'il catalysait le transfert d'électrons du NADH réduit au système cytochrome.

Donc au 9ème jour d'incubation tous les éléments histochimiques nécessaires à l'élaboration des stéroïdes sont présents.

D'autre part en microscopie électronique, les modifications des organites cellulaires commencent au 10ème jour avec le développement du réticulum endoplasmique qui pourrait traduire comme nous le verrons ultérieurement l'influence de la sécrétion d'ACTH.

Ce n'est qu'aux 11ème et 12ème jour que l'on observe des signes d'activité cellulaire et une augmentation du nombre de liposomes et de mitochondries dont la structure évolue ultérieurement.

L'étude histochimique des cellules corticales avait pour but non seulement de rechercher le moment d'apparition de certains constituants fondamentaux, mais d'essayer de trouver à partir de quel stade le cortex surrénal ayant acquis tous ses caractères de différenciation peut-être fonctionnel.

WILLIER (1954) pensait que la période du 10ème au 13ème jour est la phase de départ, de démarrage fonctionnel de la glande surrénale. Cette date a été confirmée par BOUCEK et Coll. (1966) qui situent aux 11ème et 12ème jours le développement de l'activité fonctionnelle du cortex.

BONHOMMET et WENIGER (1967) ont montré que des surrénales embryonnaires de Poulet de 14 jours en incubation, sont capables de synthétiser de la corticostérone, de l'aldostérone, de la 11 déoxycorticostérone ^{14}C à partir d'acétate ^{14}C comme précurseur.

PEDERNERA (1971) a mis au point une méthode de recherche de corticostéroïdes à faible concentration, basée sur les modifications produites *in vitro* par ces hormones sur la hauteur de la muqueuse duodénale de l'embryon de Poulet. A l'aide de cette méthode une sécrétion hormonale a pu être détectée dans des surrénales embryonnaires de Poulet de 8 jours d'incubation.

Nos résultats histochimiques nous ont permis de constater que les éléments impliqués dans l'élaboration des stéroïdes sont en place très précocement. Mais cela ne suffit pas à conclure à l'existence d'une sécrétion hormonale au 9ème jour. D'autre part, les données morphologiques ultrastructurales nous avaient révélé qu'aux 10ème et 12ème jours les signes d'activité cellulaire sont certains. L'activité synthétique doit donc démarrer lentement à partir des stades très précoces (6ème-8ème jour), mais ce n'est qu'au 10ème jour que les organites cellulaires se modifient, traduisant ainsi l'activité fonctionnelle des cellules corticales.

Ces résultats seront complétés au cours de l'étude expérimentale effectuée au moyen d'injections d'ACTH et de métopirone.

HISTOGENESE
DES
CELLULES ADRENALES OU MEDULLAIRES

I - CARACTERES MORPHOLOGIQUES

A) - INTRODUCTION

Le second constituant de la glande surrénale est le tissu adrénal ou médullaire, qui forme chez les Oiseaux des îlots disséminés entre les cordons corticaux.

Nous avons vu dans le chapitre "HISTORIQUE" que la médullosurrénale a été l'objet d'une longue suite de travaux qui ont abouti à la découverte de deux hormones médullosurrénaliennes (catécholamines) : l'adrénaline et la noradrénaline, et à leur synthèse. Ces catécholamines sont stockées dans des grains sécrétoires : les grains chromaffines (COUPLAND 1965). Les travaux histologiques et histochimiques ont identifié deux types distincts de cellules médullosurrénaliennes et ont tenté de les relier l'un à l'adrénaline et l'autre à la noradrénaline. La taille des granules a été un critère de distinction entre les cellules (WOOD 1962). Les gros granules contiendraient de la noradrénaline, tandis que l'adrénaline serait concentrée dans la fraction de centrifugation de petits granules (HAGEN et BARNETT 1960).

On a observé que la fixation au glutaraldéhyde suivie d'acide osmique fait apparaître des différences structurales entre les granules sécrétoires, en effet, certains granules de densité modérée, montrent une fine granulation interne, tandis que d'autres sont très denses et homogènes. Il a été prouvé par COUPLAND (1964), COUPLAND et HOPWOOD (1966), ELFVIN (1965), TRAMEZZANI et Coll. (1964), WOOD et BARNETT (1964) que la noradrénaline est stockée dans les cellules médullaires qui renferment des granulations très denses. La noradrénaline forme avec le glutaraldéhyde un complexe insoluble dans l'eau, qui devient très dense aux électrons après passage dans l'acide osmique. L'adrénaline ne peut pas former de liaison covalente avec le glutaraldéhyde et une partie de l'adrénaline s'échappe du granule au cours des lavages et de la déshydratation. La densité des granules d'adrénaline est donc plus faible que celle des granules de noradrénaline ce qui permet de distinguer les cellules stockant l'adrénaline, de celles stockant la noradrénaline. Mais, les études en microscopie électronique sur les types cellulaires de la médullosurrénale ont apporté des résultats contradictoires.

LEVER en 1955 a décrit des cellules claires et des cellules sombres dans la médullosurrénale et a pensé qu'elles représentaient des stades sécrétoires de la cellule chromaffine.

WETZSTEIN (1957) a décrit deux types de cellules chromaffines chez le Chat, le Cobaye et la Souris : les cellules principales (Hauptzellen) et les cellules accessoires (Nebenzellen). Ces dernières ont moins de granules chromaffines mais ceux-ci sont de plus grande taille que ceux des cellules principales. WETZSTEIN a émis l'hypothèse que les cellules principales sont des éléments qui stockent l'adrénaline et que les cellules accessoires stockent la noradrénaline.

De même YATES, WOOD, DUNCAN (1962) ont distingué deux types de cellules médullosurrénaliennes chez le Hamster : des cellules stockant l'adrénaline (A. cells) ayant des granules osmiophiles de 700 à 1 000 Å de diamètre et des cellules stockant la noradrénaline (N. cells) dont le cytoplasme plus dense que celui des premières renferme des granules de 1 000 à 3 500 Å.

MICHEL-BECHET et Coll. (1963) ont décrit quatre types de cellules dans la médullosurrénale chez le Hamster, mais si trois d'entre elles représentent pour les auteurs différents états fonctionnels des éléments chromaffines, le quatrième type serait une cellule corticale, les auteurs ne distinguent pas les cellules à adrénaline des cellules à noradrénaline et suggèrent qu'il y a une transition graduelle d'un type cellulaire à un autre.

L'ultrastructure du tissu adrénal de la glande surrénale des Oiseaux n'a pas suscité de nombreux travaux.

KANO (1959) décrit l'ultrastructure de la médullosurrénale de la Poule et y reconnaît deux types cellulaires. Le premier type contient de nombreux granules sphériques de taille variable (entre 40 et 350 m μ). Ces grains sont constitués d'une partie dense séparée de la membrane par un halo clair d'épaisseur variable avec l'âge : étroit chez le jeune Poulet, il devient plus large chez les animaux âgés. Le second type contient des granules qui sont polymorphes, souvent en forme de virgule.

L'auteur note également la présence d'organites tels que : appareil de Golgi, mitochondries, et chez les sujets âgés il observe de grosses gouttelettes osmiophiles de structure irrégulière, il suppose que ces gouttelettes peuvent provenir de catécholamines ou d'infiltration graisseuse.

FUJITA et MAKINO (1962) ont observé en microscopie électronique les granules sécrétoires de la médullosurrénale de Poulet de 2 à 5 jours. Tous ces granules sont délimités par une membrane. Ces auteurs ont également trouvé deux types cellulaires, l'un contenant des granules sphériques à fine granulation interne, l'autre renfermant des granules qui présentent une masse centrale de forme irrégulière séparée de la membrane par un espace clair. Ces auteurs notent que la membrane du granule peut être parfois en contact avec la membrane cellulaire, et qu'ainsi la substance interne du granule peut être excrétée dans l'espace intercellulaire ou péricapillaire.

BENEDECZKY (1966) a fait des observations ultrastructurales sur la médullosurrénale du Poulet âgé de 15 jours. Bien que l'auteur mentionne les différences de taille, de forme, de densité entre les granules, il ne conclut pas à l'existence de types cellulaires distincts.

En ce qui concerne l'ultrastructure du tissu adrénal au cours du développement chez l'embryon de Poulet aucune étude systématique n'a été entreprise.

B) - RESULTATS. CARACTERES ULTRASTRUCTURAUX

Les cellules adrénales sont des cellules d'origine neurale qui migrent des crêtes neurales thoraco-lombaires (HAMMOND et YNTEMA 1947, STRUDEL 1953). Par des expériences de greffes interspécifiques (remplacements de fragments du tube neural d'embryons de Poulet par des fragments homologues d'embryons de Caille de même stade) LE DOUARIN (1971) a déterminé chez l'embryon de Poulet, que les cellules adrénales proviennent de la région du névraxe situé au niveau des somites 18 à 24.

Nos observations ont été faites à partir du 5ème jour d'incubation. A ce stade, les prélèvements des territoires situés à la partie antérieure des ébauches corticales ont montré des cellules migratrices qui se trouvent le long des parois de l'aorte et dans le mésenchyme entourant les ébauches corticales, mais aucune d'entre elles n'est encore parvenue au contact des îlots corticaux. Ces cellules migratrices sont identifiables par le fait que leur cytoplasme renferme quelques granules denses aux électrons. (Planche XII Figure 45)

Ces cellules sont de grande taille, de forme allongée à gros noyau irrégulier renfermant un ou deux nucléoles. Le cytoplasme est réduit à une

PLANCHE XII

PLANCHE XII

Figure 45 : Embryon 6 jours d'incubation. Cellule migratrice située près des ébauches corticales mais n'ayant pas encore pénétré entre les flots corticaux.

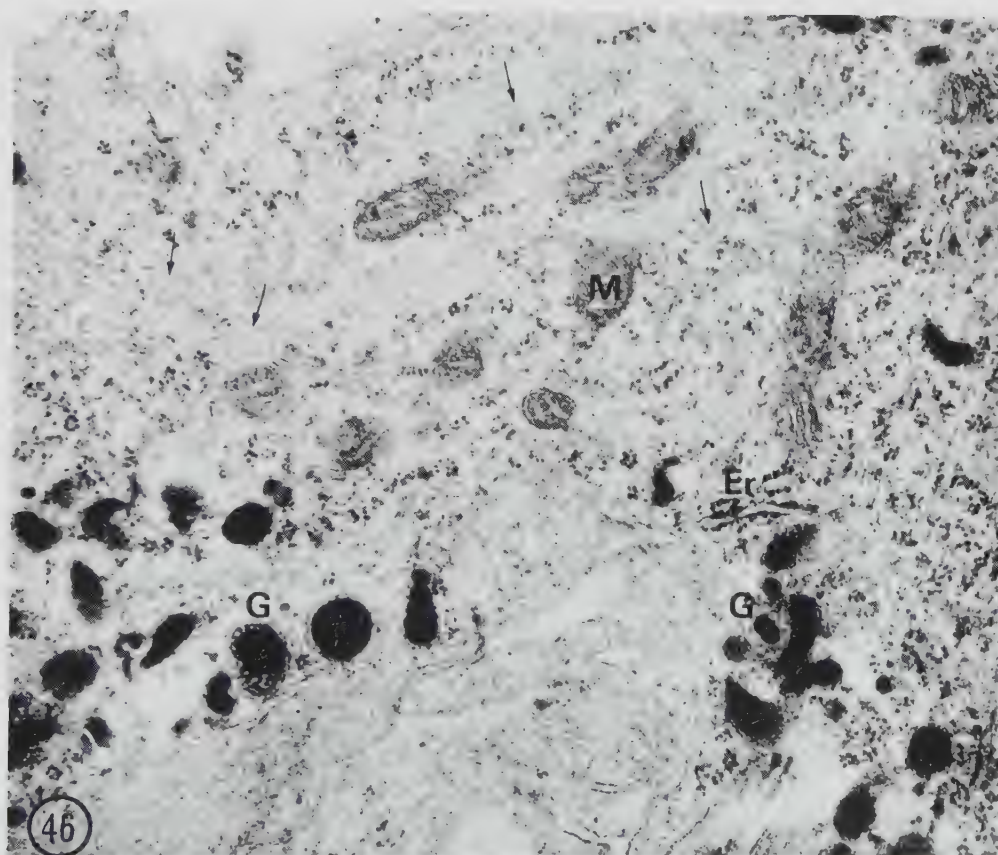
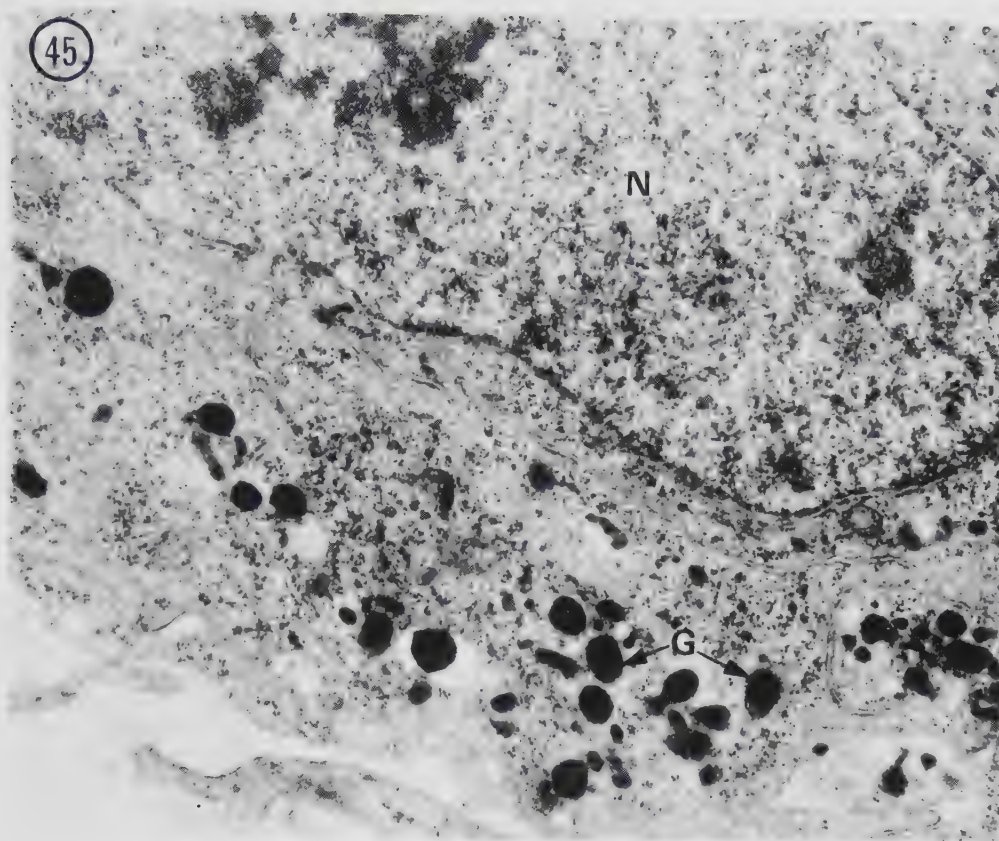
Cette cellule renferme déjà des grains de catécholamines. Son cytoplasme est très riche en ribosomes.

On observe des prolongements cytoplasmiques de la cellule comparables à des pseudopodes.

G : grains de catécholamines ; N : noyau. (x 9 000)

Figure 46 : Embryon 7 jours d'incubation. Cellule médullaire ayant pénétré dans l'ébauche corticale. Le cytoplasme renferme des mitochondries de petite taille, des grains de catécholamines, un peu d'ergastoplasme et de très nombreux microfilaments (→).

On observe également dans ces jeunes stades des grains de catécholamines dont la morphologie est semblable à celle des grains que l'on rencontre chez l'adulte.



mince bande entourant le noyau. Il contient de nombreux ribosomes généralement associés en petits groupes. Les mitochondries sont de petite taille, ovales ou allongées.

Le caractère le plus important de ces cellules à ce stade est la présence dans leur cytoplasme de granules osmiophiles. Ces granules ne sont pas très nombreux, ils sont entourés par une membrane bien visible, leur forme est arrondie ou allongée, leur taille et leur densité sont variables, leur contenu homogène et dense est accolé sur une petite distance à la membrane ou séparé de celle-ci par un espace clair ou très finement granuleux.

Au 6ème jour d'incubation, les cellules migratrices sont arrivées au contact des ébauches corticales. Elles montrent des pseudopodes très bien développés qui se terminent souvent par de fins prolongements cytoplasmiques. Parvenus au contact des ébauches corticales, ces pseudopodes s'enfoncent entre les massifs cellulaires.

Le cytoplasme des cellules adrénales est riche en ribosomes libres ou associés en polysomes. Quelques éléments d'ergastoplasme sont présents. Les mitochondries sont petites, allongées, rectilignes ou courbées.

On remarque souvent au cours de ces jeunes stades des vésicules de pinocytose situées le long des membranes plasmiques, elles sont très nombreuses au niveau des pseudopodes ; ceux-ci apparaissent alors emplis de petites vésicules.

On observe aussi à ces stades de nombreux microfilaments parcourant le cytoplasme en tout sens. (Planche XII Figure 46)

L'appareil de Golgi situé près du noyau est composé de minces saccules empilés et de nombreuses petites vésicules vides ou contenant un fin matériel granuleux ou même dense et homogène.

Les granules osmiophiles sont en plus grand nombre que précédemment. Ils ne sont pas toujours répartis dans tout le cytoplasme et sont souvent groupés. (Planche XII Figure 46) Leur forme est très variable : arrondie, allongée, en virgule, en bâtonnet, présentant un renflement à une extrémité, en haltère. Ils peuvent également être formés de deux petites parties denses situées à l'intérieur de la membrane, ces images sont dues à l'incidence de la coupe. La membrane qui les entoure est toujours nettement visible. Leur densité est variable : le granule peut-être très dense et homogène, ou constitué

d'une partie centrale dense entourée par un halo de matériel granuleux, ou même légèrement dense et montrant une fine granulation interne.

Du 8ème au 10ème jour, les cellules adrénales ont pénétré dans toute l'ébauche corticale, elles sont souvent en file ou regroupées en petits flots. Leurs contours sont sinueux, leurs prolongements cytoplasmiques pénètrent entre les flots corticaux et autour des capillaires. Elles ne présentent ni desmosome, ni différenciation cellulaire au niveau de leurs membranes adjacentes ; il y a peu de changement au niveau des organites, seul le nombre des granules a augmenté.

On observe toujours des vésicules de pinocytose le long des membranes plasmiques et à l'intérieur du cytoplasme, ces dernières sont facilement identifiables par la présence d'une couche de matériel légèrement dense, d'orientation radiaire qui les délimite.

Aux 12ème et 13ème jours, les cellules adrénales sont regroupées en flots. De taille variable, leurs contours sont plus arrondis et plus réguliers que précédemment.

Deux faits sont caractéristiques à ce stade :

- l'augmentation du nombre des granules de densité modérée et de contenu finement granuleux.

- la coexistence très fréquente dans une même cellule de grains de morphologie et de densité différentes.

Dans leur cytoplasme on note une augmentation du nombre de sacs ergastoplasmiques.

Aux 15ème et 16ème jours, les cellules médullaires sont plus nombreuses. La densité du cytoplasme s'est accrue, il y a une augmentation du nombre des mitochondries.

A partir de ce stade les cellules adrénales ont tendance à contenir des granules de même type c'est à dire que dans une même cellule la majorité des granules est de forme arrondie à contenu modérément dense et finement granuleux, tandis que dans d'autres cellules la plupart des grains sont extrêmement denses, polymorphes ou arrondis, sans granulation interne, et excentrés par rapport à leur membrane. Le halo clair situé autour du matériel dense

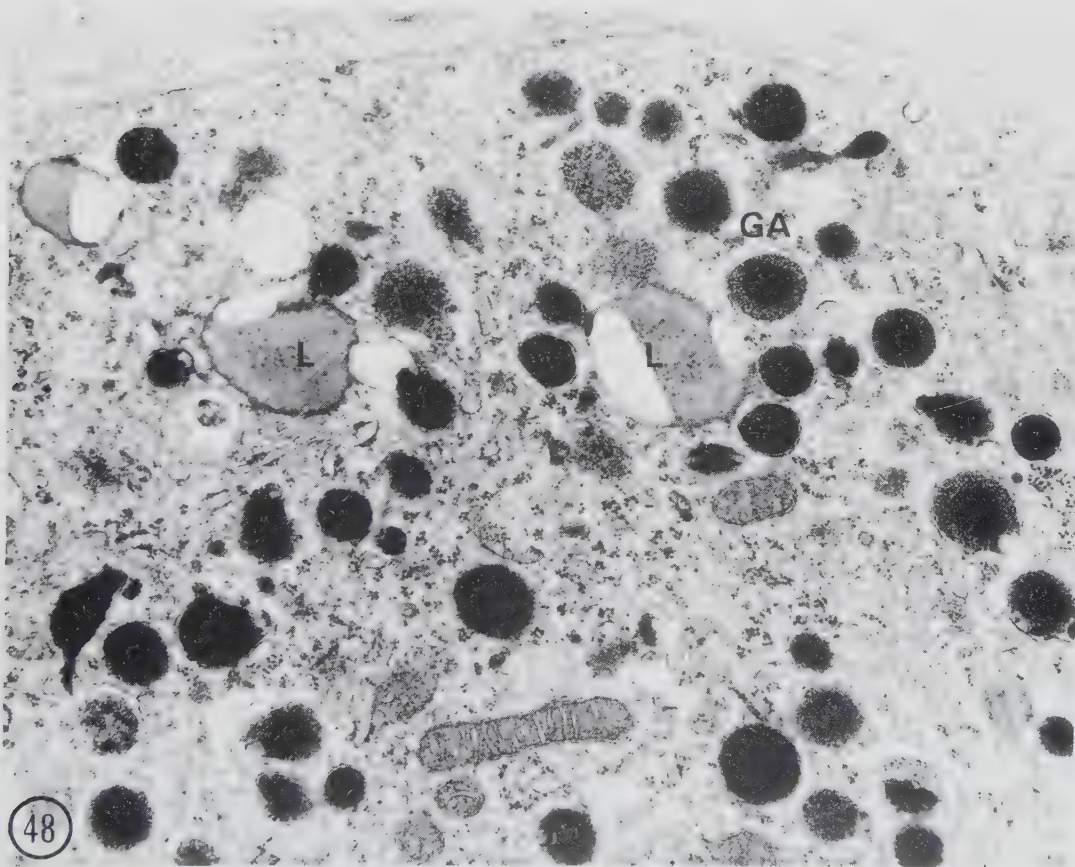
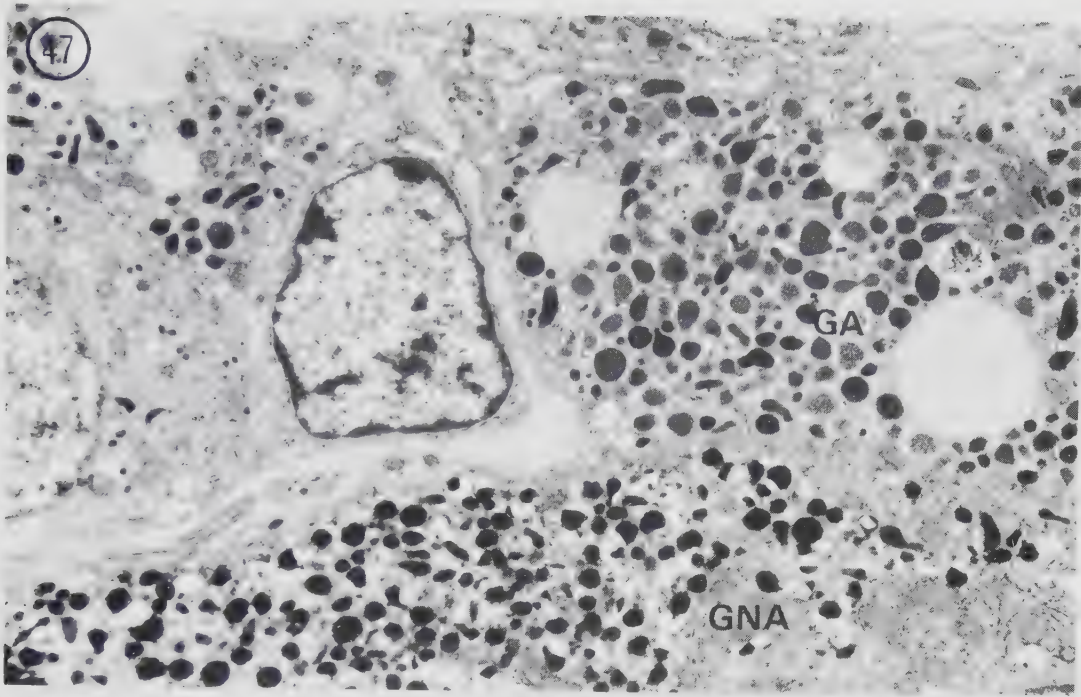
PLANCHE XIII

PLANCHE XIII

Figure 47 : Poussin 8 jours. Cellules médullaires. L'une renferme des grains polymorphes de très forte densité dont le contenu est généralement excentré à l'intérieur du sac membranaire et sont considérés comme étant riches en noradrénaline (GNA).

Les grains de l'autre cellule médullaire sont de densité variable mais inférieure à celle des grains précédents et sont considérés comme étant riches en adrénaline. (GA) (x 4 000)

Figure 48 : Poussin 1 mois. Cellule médullaire renfermant des grains (GA) de morphologie semblable à celle des grains "d'adrénaline" des Mammifères. Leur forme est arrondie, leur contenu disposé au centre du sac membranaire est homogène ou finement granulaire, très fréquemment on y distingue un centre plus dense. Cette cellule médullaire renferme également quelques enclaves lipidiques (L). (x 11 000)



est plus large que précédemment. Cette répartition des grains se traduit donc par la distinction de deux types de cellules. Cependant, toutes les cellules n'appartiennent pas à ces types extrêmes. Il existe des cellules correspondant à des types intermédiaires.

Du 18ème au 20ème jour, les cellules adrénales groupées en filots sont contiguës. Leurs membranes plasmatiques montrent de nombreuses microvillosités, des invaginations, des cils, mais elles ne forment aucune différenciation de type desmosome avec les cellules voisines. Entre ces cellules, on observe des fibres nerveuses et des fibres conjonctives.

Comme précédemment les cellules adrénales sont de deux types, chacun d'eux renfermant de très nombreux grains osmiophiles. (Planche XIII Figure 47)

Le premier type cellulaire contient essentiellement des grains polymorphes extrêmement denses, le cytoplasme renferme peu d'autres organites : des ribosomes, des mitochondries et quelques tubules d'ergastoplasme qui sont généralement localisés dans une zone périnucléaire.

Le second type cellulaire dont la différence principale par rapport au type précédent réside dans la densité des granules, contient des grains arrondis moyennement denses, certains d'entre eux ont un centre très dense homogène et une bordure granuleuse. Ces cellules ont de nombreux autres organites :

- un appareil de Golgi bien développé entouré par de nombreuses vésicules et par de petits granules, les saccules golgiens sont quelquefois dilatés à leurs extrémités et renferment un matériel dense semblable à celui des granules osmiophiles.

- des mitochondries en plus grand nombre qu'aux stades précédents, rondes ou allongées, à matrice modérément dense, à crêtes parallèles transversales ou obliques.

- des tubules ergastoplasmiques toujours situés au voisinage des mitochondries.

- des inclusions qui semblent de nature lipidique. (Planche XIII Figure 48)

- des cils et des formations plurivésiculaires situés à proximité de l'appareil de Golgi.

- des microtubules et des filaments.

- des vacuoles nettement délimitées par une membrane, vides ou emplies d'un matériel de très faible densité.

Grains riches en noradrénaline

Grains riches en adrénaline



MORPHOLOGIE DES GRAINS DES CELLULES ADRENALES APRES FIXATION
GLUTARALDEHYDE-ACIDE OSMIQUE

C) - DISCUSSION

Les observations faites sur notre matériel embryonnaire fixé par la double fixation glutaraldéhyde-acide osmique nous ont montré les faits suivants :

1°) - La morphologie des granules osmiophiles des cellules adrénales du Poulet est la même que celle des granules osmiophiles de la médullosurrénale des Mammifères.

Nous retrouvons chez les embryons deux types de granules toujours entourés par une membrane bien visible :

- l'un correspond à des granules très denses polymorphes, à contenu homogène et souvent excentré à l'intérieur de la membrane ; une partie du matériel dense est toujours en étroit contact avec la membrane.

- l'autre type correspond à des granules de densité variable, arrondis, à contenu finement granuleux séparé de la membrane par un halo clair et mince.

La double fixation glutaraldéhyde-acide osmique agit comme une méthode histochimique pour l'identification des granules stockant la noradrénaline. COUPLAND (1965) en utilisant cette fixation a trouvé une correspondance exacte entre la trame de distribution des cellules ayant réduit l'acide osmique et celle observée après application des méthodes à l'iodate de potassium ou à

la fluorescence. La noradrénaline se révèle en effet sous forme d'un précipité très dense dû à la réaction entre l'amine et le glutaraldéhyde. On a donc reconnu deux significations différentes aux deux types de granules : les granules de très forte densité sont très riches en noradrénaline, tandis que ceux de densité modérée renferment surtout de l'adrénaline. Il semble donc logique de penser que chez l'embryon de Poulet comme chez les Mammifères, la noradrénaline est stockée dans les granules de très forte densité.

2°) - La présence de ces granules sécrétoires étant une indication de l'activité cellulaire, la différenciation des cellules adrénales est extrêmement précoce puisque dès le 5ème jour d'incubation, on distingue la présence de granules denses entourés d'une membrane, dans les cellules sympathiques en cours de migration qui sont à l'origine des cellules adrénales.

Il semblerait donc d'après nos observations ultrastructurales, en nous basant sur le seul critère de la densité, que les granules qui sont localisés dans les cellules sympathiques migratrices pourraient correspondre à un contenu riche en noradrénaline.

Au cours des stades précoces, il est extrêmement difficile de classer la plupart des granules dans un type ou dans l'autre, car ces granules sont pour la plupart, tous de même densité. Pourtant on observe dès le 6ème jour, des granules des deux types coexistant dans certaines cellules.

Le très grand nombre de granules denses rencontrés tout au long du développement suggère que la noradrénaline est prépondérante dans les cellules adrénales embryonnaires dès les premiers stades et va le demeurer.

Les grains arrondis de densité modérée à structure finement granulaire considérés comme riches en adrénaline, apparaissent à partir du 6ème jour, leur nombre augmente surtout du 12ème jour jusqu'à la fin de l'incubation. A partir du 14ème jour, certaines cellules renferment une majorité de granules de ce type. Ces cellules étant de plus en plus nombreuses jusqu'à l'éclosion suggère que la capacité de méthylation de la cellule (la méthylation étant la dernière étape dans la synthèse d'adrénaline) se développe progressivement. L'importante augmentation du nombre de ces cellules à partir du 14ème jour, peut être en relation avec l'activité des cellules corticales, activité intense à partir du 12ème jour.

En effet, de nombreux travaux ont montré l'influence des corticoïdes sur la dernière étape de la synthèse d'adrénaline : JOST et ROFFI (1958)

chez des foetus de Rat, ont obtenu une augmentation du taux d'adrénaline après injection de cortisone ou d'hydrocortisone.

VITRY (1966) a obtenu in vitro une augmentation du taux d'adrénaline dans des broyats de médullosurrénale par adjonction de broyat de corticosurrénale.

ERÄNKÖ, LEMPINEN et RAISANEN (1966) ont montré que chez le Rat à la naissance, le tissu chromaffine extrasurrénalien qui dégénère normalement en une semaine, persiste et peut même stocker de l'adrénaline au lieu de noradrénaline si les animaux reçoivent quotidiennement des injections d'hydrocortisone.

COUPLAND et MAC DOUGALL (1966), COUPLAND (1968) ont démontré que des cultures de cellules extrasurrénaliennes qui synthétisent normalement de la noradrénaline peuvent synthétiser de l'adrénaline si on ajoute de la corticostérone au milieu de culture.

Les hormones corticosurrénaliennes peuvent donc agir sur les cellules chromaffines et les inciter à synthétiser et à stocker de l'adrénaline.

WURTMAN et AXELROD (1966) ont montré que chez le Rat l'activité de l'enzyme PNMT (phénylethanolamine N méthyltransférase) catalysant la méthylation de la noradrénaline en adrénaline, qui chute après hypophysectomie est restaurée par des injections quotidiennes de dexaméthasone.

Les travaux biochimiques de WASSERMANN et BERNARD (1970) ont également démontré chez l'embryon de Poulet l'influence des corticoïdes sur le démarrage de l'activité PNMT. Les auteurs ont dosé l'adrénaline dans les glandes surrénales embryonnaires : la très faible teneur trouvée à 10 jours d'incubation augmente régulièrement jusqu'à 13 jours, puis croît très brusquement au cours de la période 13-15 jours jusqu'à l'éclosion. Les auteurs rappellent que le développement de l'activité enzymatique conduisant à la production d'adrénaline est en relation avec l'activité du cortex surrénal qui se situe chez l'embryon de Poulet à 11-12 jours. La relation entre l'intense activité corticosurrénalienne aux 11-12ème jours et l'augmentation de production d'adrénaline (13-15 jours) suggère une influence des corticoïdes sur l'activité PNMT. Des embryons de Poulet de 8 jours recevant des injections de dexaméthasone ont une production d'adrénaline triple de la valeur normale au stade 13-15 jours. Les corticoïdes ont donc une action sur l'activité PNMT.

3°) - L'étude ultrastructurale de l'histogenèse des cellules médullaires nous a permis de mieux comprendre le développement et la différenciation des deux types cellulaires.

A partir du 14ème jour, les deux types de granules ont tendance à être localisés dans des cellules différentes d'où la distinction de deux types cellulaires. Chaque cellule renferme donc une majorité de granules d'un même type, mais on observe toujours quelques granules de l'autre type. Ce qui signifie donc que certaines cellules sont très riches en noradrénaline, et d'autres très riches en adrénaline, mais il y a cependant dans chaque type, une faible proportion de l'autre amine.

COUPLAND et WEAKLEY (1968) ont également observé chez le Lapin que des mélanges de granules riches en adrénaline et de granules riches en noradrénaline peuvent se rencontrer dans la même cellule médullosurrénalienne.

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre HISTORIQUE, deux théories ont été émises pour expliquer l'existence de ces types cellulaires : la théorie dualiste pour laquelle chaque type cellulaire ne produit qu'une catécholamine, et la théorie uniciste pour laquelle toutes les cellules sont capables de sécréter de l'adrénaline et de stocker les catécholamines, selon les conditions physiologiques certaines cellules ont un rôle de stockage.

Au cours des stades embryonnaires, nos observations ultrastructurales de cellules adrénales qui renferment des grains de deux types suggèrent donc que toutes les cellules sont capables de réaliser la synthèse de l'adrénaline.

4°) - En ce qui concerne la formation de granules nous avons vu que certains saccules de l'appareil de Golgi dont les extrémités sont dilatées, de même que de petites vésicules situées au voisinage du Golgi, renferment du matériel dense aux électrons. Des observations semblables ont d'ailleurs été faites par de nombreux auteurs. Ce matériel présente certaines analogies avec celui des granules sécrétoires, taille, densité, structure finement granuleuse.

Ces faits peuvent donc être considérés comme venant appuyer l'hypothèse selon laquelle les granules sont formés dans l'appareil de Golgi et stockés ensuite dans le cytoplasme cellulaire, mais il est également très possible que les membranes élaborées par l'appareil de Golgi soient capables de concentrer les catécholamines synthétisées dans le cytoplasme (les transforma-

tions dopa $\longrightarrow$ dopamine et noradrénaline $\longrightarrow$ adrénaline s'effectuent dans le cytoplasme). Ce mécanisme pourrait s'effectuer non seulement au voisinage de l'appareil de Golgi mais dans toute la cellule, car nous avons souligné la présence de petites vésicules vides qui ne sont pas toujours situées dans l'aire golgienne.

5°) - Sécrétion des catécholamines. Nous n'avons jamais observé de granules libérés ou sur le point d'être libérés hors de la cellule dans l'espace extracellulaire. Il est certain que nous observons quelquefois des granules situés au contact de la membrane plasmique, mais ces cas sont assez rares. Il est difficile après observation de notre matériel embryonnaire normal de confirmer l'hypothèse selon laquelle le contenu granulaire serait libéré directement dans l'espace extracellulaire après fusion des membranes granulaires et plasmiques (COUPLAND 1965, DE ROBERTIS et VAZ FERREIRA 1957, DE ROBERTIS et SABATINI 1960). Les observations de DINER (1967) sur la médullosurrénale du Hamster sont venues également appuyer cette hypothèse de la libération des catécholamines par expulsion de granules.

BENEDECZKY (1966) en exposant des embryons de Poulet âgés de 14 jours à l'action du froid, observe des granules de catécholamines dans les sinusoides et de nombreuses extrusions de fragments cytoplasmiques contenant des granules de catécholamines. L'auteur précise que chez des embryons témoins, il n'a jamais observé de telles extrusions cytoplasmiques de cellules médullaires dans les sinusoides.

Par contre, d'autres auteurs (CLEMENTI et ZOCHE 1963, MICHEL-BECHET, COTTE et HAON 1963, YATES 1963, 1964) pensent que la dégranulation peut se produire loin de la membrane plasmique, que les amines peuvent quitter le granule, passer dans le cytoplasme, diffuser au travers de la membrane plasmique et être libérées hors de la cellule.

Nous verrons ultérieurement, dans l'étude expérimentale de stimulation des cellules adrénales à libérer leurs catécholamines que nos observations sont en faveur de cette dernière hypothèse.

II - CARACTERES HISTOCHIMIQUES

A) - INTRODUCTION

Les cellules de la médullosurrénale sont caractérisées par leur contenu en catécholamines. L'étude de leurs caractères histochimiques et de leur différenciation est donc basée essentiellement sur la présence de ces substances. L'adrénaline et la noradrénaline possèdent des propriétés réductrices qui sont utilisées dans les réactions histochimiques.

Les réactions dont nous disposons actuellement pour l'étude de la médullosurrénale dérivent très souvent des anciennes techniques citées dans le chapitre HISTORIQUE [réaction sidérraffine de VULPIAN (1856), réaction chromaffine de HENLE (1865), réaction osmiophile de MULON (1904), réaction argentaffine de LAIGNEL-LAVASTIN (1905)]

De nombreuses méthodes ont été mises au point et perfectionnées en vue de la démonstration sélective de la noradrénaline, parmi celles-ci, nous pouvons citer les réactions suivantes :

- iodate de potassium (HILLARP et HOKFELT 1953).
- fluorescence à la formaldéhyde (ERANKÖ 1952).
- glutaraldéhyde-nitrate argent ammoniacal (TRAMEZZANI et Coll. 1964).
- glutaraldéhyde-bichromate de potassium (WOOD et BARRNETT 1964).
- glutaraldéhyde-acide osmique (COUPLAND 1964).
- fluorescence aux vapeurs de formaldéhyde (CARLSSON et Coll. 1962).

Ces techniques histochimiques ont permis l'étude de la distribution des cellules stockant l'adrénaline et la noradrénaline dans les glandes surrénales de diverses espèces.

La majorité des recherches effectuées en vue de l'étude du développement de la médullosurrénale a été réalisée chez les foetus de Mammifères (Rat, Chat, Cobaye, Lapin). Elles avaient pour but principal de rechercher la présence d'adrénaline et de noradrénaline.

Dans les surrénales foetales, on a trouvé que la noradrénaline était la première catécholamine à apparaître et qu'elle représentait la plus grande proportion du contenu total des catécholamines. La quantité d'adrénaline s'accroît en fin de gestation [PICON (1964), chez le foetus de Lapin, ROFFI (1965) chez le foetus de Rat.]

Chez les Oiseaux, les travaux histochimiques sont dûs à KAR (1950) ARVY (1961), GHOSH et Coll. (1962). La répartition des catécholamines dans la glande surrénale de la Poule a été établie par COUPLAND (1953), par ERANKO (1957) et par SCHUMANN (1957).

Nous possédons quelques indications sur la différenciation des cellules chromaffines de la glande surrénale embryonnaire du Poulet, mais les auteurs aboutissent à des résultats variables sur le début de cette différenciation.

Pour HAYS (1914) elle débute au 7ème jour, lorsque les cellules adrénales ont pénétré entre les cordons corticaux.

" These cells enter the cortical substance as indifferent cells and later become differentiated to form the chromaffin substance of the glands "

Pour OKUDA (1928) l'adrénaline est présente chez des embryons de Poulet de 8 jours tandis que pour SUN (1932) c'est à 9 jours $\frac{1}{2}$ que l'épinephrine (adrénaline) apparaît.

BRAUER (1932) a observé une réaction chromaffine au 8ème jour d'incubation. DAWSON (1953) par une méthode d'imprégnation argentique observe des cellules différenciées avec de fins granules noirs dans leur cytoplasme à 5 jours 7 heures.

SIVARAM (1968) a recherché la distribution de l'adrénaline et de la noradrénaline dans les cellules adrénales de l'embryon de Poulet et a trouvé que les deux catécholamines sont sécrétées à partir du 11ème jour d'incubation, que la majorité des cellules chromaffines sécrètent de la noradrénaline et que cette hormone est prépondérante à tous les stades du développement. Il a précisé que les cellules sécrétant de l'adrénaline prédominent dans la couche subcapsulaire.

MEZHININ (1969) met en évidence la présence d'adrénaline dans le tissu chromaffine au stade de 9-10 jours, mais ne peut démontrer au moyen de la réaction à l'iodate de potassium, la présence de noradrénaline chez des embryons avant le 11ème jour. Il trouve également que cette dernière hormone est prépondérante pendant toute la période embryonnaire et au cours des deux premières semaines postnatales. C'est seulement dans les stades ultérieurs que l'adrénaline devient prépondérante.

Nos observations ultrastructurales nous ayant montré que les cellules sympathiques migratrices au 5ème jour d'incubation contiennent des granules osmiphiles ressemblant à ceux des cellules adrénales, nous avons entrepris

une recherche de mise en évidence de catécholamines à partir du 5ème jour d'incubation. Nous avons ainsi suivi la différenciation des cellules adrénales et l'évolution de leurs caractères histochimiques.

B) - RESULTATS

Il n'existe aucune technique permettant de mettre en évidence l'adrénaline seule, nous ne pouvons que comparer du matériel fixé pour la réaction de mise en évidence des catécholamines totales (adrénaline + noradrénaline) à du matériel fixé pour des réactions assurant la mise en évidence élective de la noradrénaline.

1°) - MISE EN EVIDENCE DE L'ENSEMBLE DES CATECHOLAMINES (adrénaline + noradrénaline) par la réaction phéochrome au mélange bichromate-chromate (HILLARP et HÖKFELT 1955)

La réaction positive se traduit par l'apparition d'une teinte jaune brune dans toutes les cellules médullaires lorsqu'on examine les coupes sans aucune coloration. Après une légère coloration de fond au bleu de toluidine, ces cellules apparaissent d'une couleur verte, plus ou moins foncée.

La réaction est positive à partir du 7ème jour lorsque les cellules adrénales ont déjà envahi les ébauches corticales mais l'intensité des colorations est assez faible jusqu'au 10ème jour.

La réaction s'intensifie progressivement et le nombre de cellules colorées se multiplie, elles forment alors de petits îlots dispersés parmi les cordons corticaux. (Planche XIV Figure 49)

A partir du 15ème jour, la teinte brune apparaît nettement dans certaines cellules (Planche XIV Figure 51). En fin d'incubation, l'ensemble des cellules médullaires est alors bien organisé en travées et en îlots. (Planche XIV Figure 50)

Les teintes obtenues dans les stades embryonnaires précoces sont assez pâles, aussi nous avons effectué sur tout notre matériel, des coupes relativement épaisses (10μ) afin d'accentuer les intensités des colorations, mais ce détail empêche une étude cytologique fine.

PLANCHE XIV

PLANCHE XIV

Figure 49 : Embryon 12 jours d'incubation.

Réaction phéochrome au bichromate-chromate (HILLARP et HOKFELT)
qui assure la mise en évidence de l'adrénaline et de la noradrénaline.
Coupe à la paraffine. Coloration de fond bleu de toluidine.
Cette réaction se traduit par un précipité jaune-brun sur l'ensemble
des cellules médullaires ou adrénales (→) (x 100)

Figure 50 : Embryon 18 jours d'incubation.

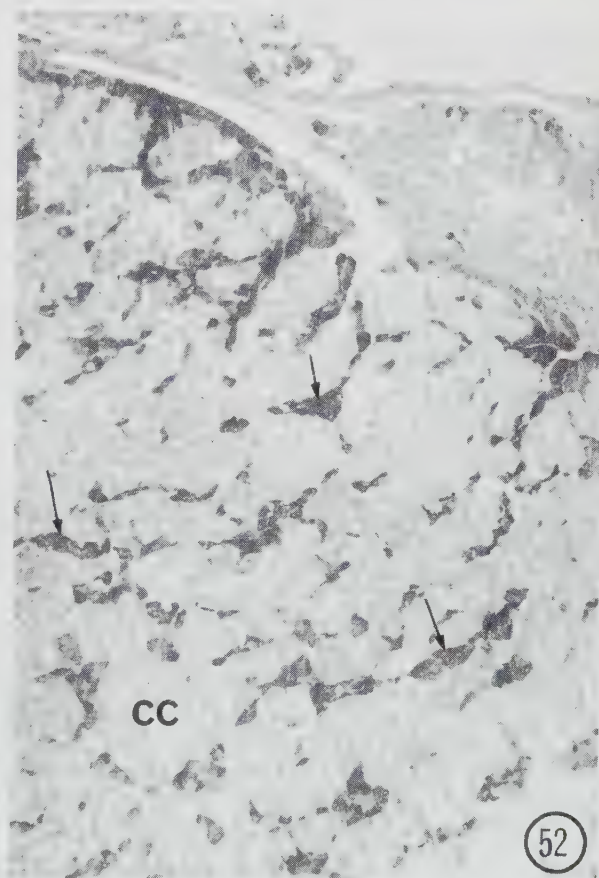
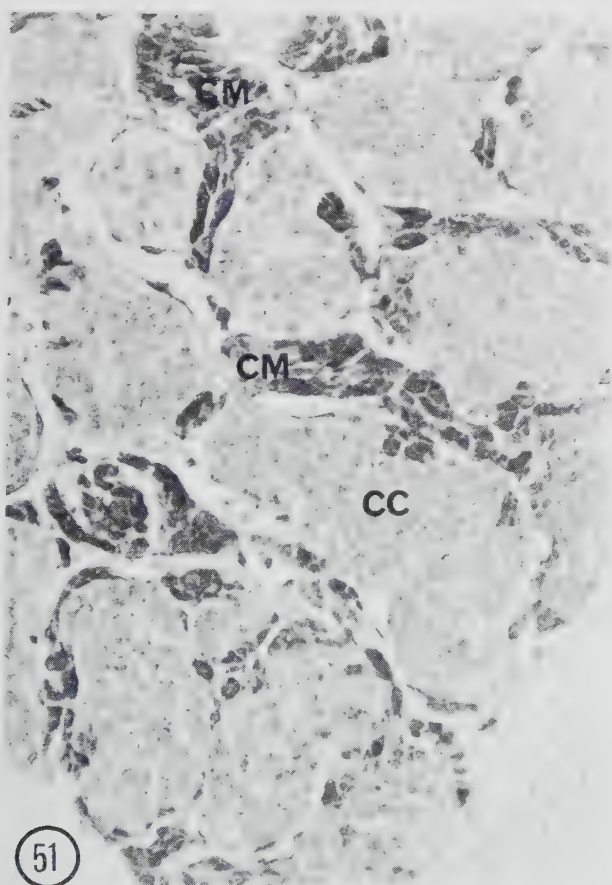
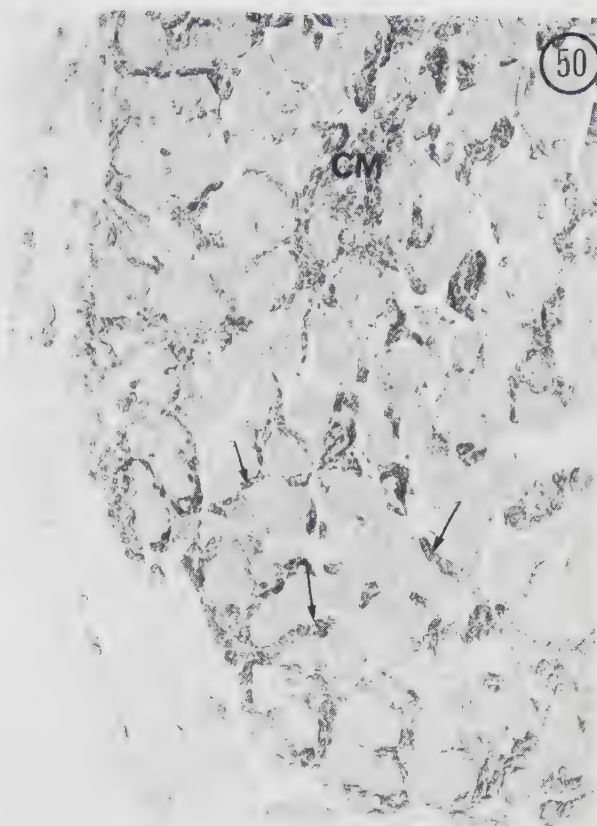
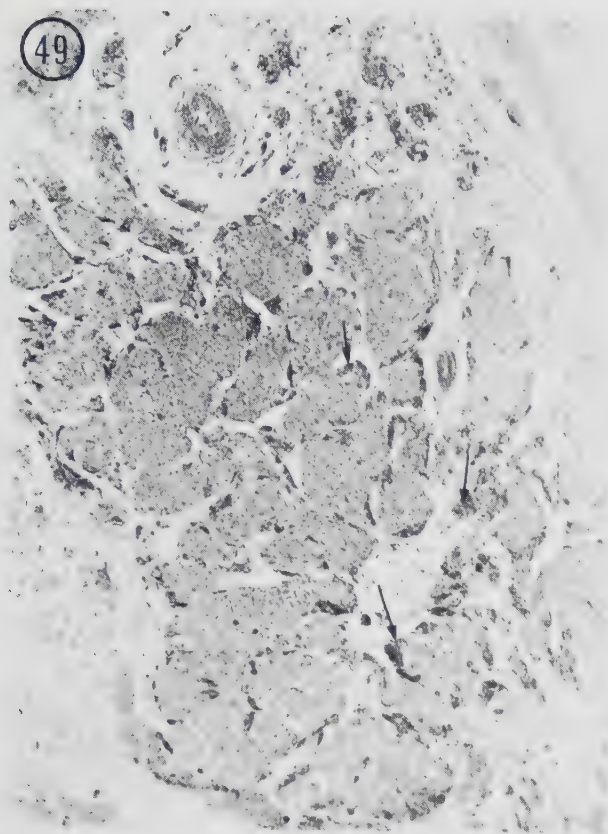
Réaction phéochrome au bichromate-chromate (HILLARP et HOKFELT).
Cette réaction permet d'obtenir une très bonne visualisation des
cellules médullaires (→) dans la glande surrénale.
CM : cellules médullaires. (x 100)

Figure 51 : Embryon 15 jours d'incubation. Réaction phéochrome au bichromate-chromate (HILLARP et HOKFELT). Les cellules adrénales sont facilement distinctes des cellules corticales, grâce au précipité jaune-brun formé en présence de leurs catécholamines.

CC : cordon cortical ; CM : cellules médullaires (x 160)

Figure 52 : Poussin 5 jours. Fixation glutaraldéhyde. Formation d'un complexe ferro-ferricyanure (HOPSU et MAKINEN) bleu sombre au niveau des cellules renfermant de la noradrénaline (→).

CC : cordon cortical. (x 63)



2°) - MISE EN EVIDENCE DE LA NORADRENALINE

Pour la démonstration histochimique de la noradrénaline, nous avons utilisé les réactions suivantes :

- iodate de potassium (HILLARP et HOKFELT 1953)
- fixation au glutaraldéhyde. Réduction de sels d'argent en milieu alcalin (TRAMEZZANI, CHIOCCHIO et WASSERMANN 1964)
- formation d'un complexe ferro-ferricyanure (HOPSU et MAKINEN 1966)
- réduction d'un sel de tétrazolium à pH alcalin (HOPSU et MAKINEN 1966)
- fixation par un mélange formol-bichromate de potassium (WOOD 1963)
- fixation au glutaraldéhyde. Réduction de bichromate de potassium (WOOD et BARNETT 1964)
- fixation au glutaraldéhyde. Réduction d'acide osmique (COUPLAND 1964)
- fixation au formol. Réaction de fluorescence (ERANKO 1952)
- réaction de fluorescence aux vapeurs de formaldéhyde (FALCK et Coll. 1962)

a) - Réaction à l'iodate de potassium

Seules les cellules adrénales contenant des grains riches en noradrénaline sont colorées en jaune clair, les cellules renfermant de l'adrénaline restent incolores. Cette coloration est extrêmement faible et commence à être visible seulement à partir du 10ème jour, elle s'intensifie à partir du 12ème jour. Elle permet de constater que les cellules adrénales à contenu noradréalinique se trouvent réparties dans tous les îlots médullaires de la glande et n'ont pas de localisation particulière en périphérie ou au centre.

b) - Réaction de TRAMEZZANI, CHIOCCHIO et WASSERMANN (1964) (fixation au glutaraldéhyde. Réduction de sels d'argent en milieu alcalin)

L'essai de cette technique sur du matériel coupé au cryostat ne nous a pas donné de bons résultats. Par contre, l'examen de coupes semi-fines provenant de pièces préparées en vue de l'étude en microscopie électronique, nous a fourni des résultats extrêmement nets et précis et nous a permis de suivre

le développement des cellules renfermant de la noradrénaline, puisque celles-ci sont très facilement identifiées.

En microscopie optique : Les cellules contenant de la noradrénaline apparaissent brunes ou noires. Une réaction positive est obtenue dès le 6ème jour dans des cellules sympathiques migratrices localisées le long des parois de l'aorte. A ce stade, certaines de ces cellules sont parvenues au contact des cordons corticaux et jusqu'au 8ème jour de très nombreuses cellules sont observées dans le mésenchyme entourant les ébauches corticales. (Planche XV Figures 53 et 54)

A ce stade, les cellules adrénales sont disposées en files ou regroupées en petits îlots entre les cordons corticaux. (Planche XV Figure 55)

La réaction est d'intensité variable au niveau des cellules adrénales, (Planche XV Figure 55), certaines apparaissent noires tandis que d'autres ont des teintes variables du brun clair au brun foncé. Ces cellules de teintes nuancées peuvent se trouver voisines dans le même îlot.

Au 15ème jour, on observe encore dans le tissu conjonctif entourant la glande, de nombreuses cellules présentant une réaction positive. (Planche XV Figure 57)

Au 18ème jour, le nombre des cellules où la réaction est très intense s'est considérablement accru. (Planche XV Figure 58)

En microscopie électronique : La réaction positive se traduit par la formation d'un précipité d'argent réduit sur des grains riches en noradrénaline. La sensibilité de cette technique nous a permis d'étudier particulièrement les stades précoces du développement.

Les prélèvements effectués chez des embryons de 5 jours, montrent les ébauches corticales sans aucune pénétration de cellules adrénales. Au voisinage de ces ébauches, se trouvent des cellules renfermant de petites granulations, ce sont les cellules sympathiques en voie de migration qui sont à l'origine des cellules adrénales. Certaines de leurs granulations sont couvertes d'un fin précipité d'argent, ce qui traduit selon les auteurs, la présence de noradrénaline au niveau de ces grains. Donc au 5ème jour d'incubation les cellules adrénales ont déjà acquis certains caractères de leur différenciation

PLANCHE XV

Mise en évidence de la noradrénaline. Réaction de TRAMEZZANI, CHIOCCHIO et WASSERMAN sur pièces; Coupes semi-fines.

Figure 53 : Embryon 8 jours d'incubation. Cellules sympathiques migratrices (→) se déplaçant le long des parois de l'aorte.

A ce stade (8ème jour) de très nombreuses cellules médullaires ont déjà pénétré entre les premiers flots corticaux (cf. Figure 55) mais plusieurs cellules migratrices isolées ou en petits groupes se trouvent encore sur la voie de migration. Elles présentent des caractères certains de différenciation puisque la réaction de TRAMEZZANI mettant en évidence la noradrénaline est positive au niveau de ces cellules.

A : aorte ; Cm : cellules migratrices. (x 400)

Figure 54 : Embryon 8 jours d'incubation.

Cellules migratrices (→) arrivant dans le voisinage des ébauches corticales.

Cm : cellules migratrices. (x 400)

Figure 55 : Embryon 8 jours d'incubation. Les cellules médullaires (adrénales) que l'on distingue facilement grâce au précipité d'argent qui les recouvre sont disposées en files ou en petits flots entre les cordons corticaux. (x 160)

Figure 56 : Embryon 12 jours d'incubation. (x 100)

Figure 57 : Embryon 15 jours d'incubation.

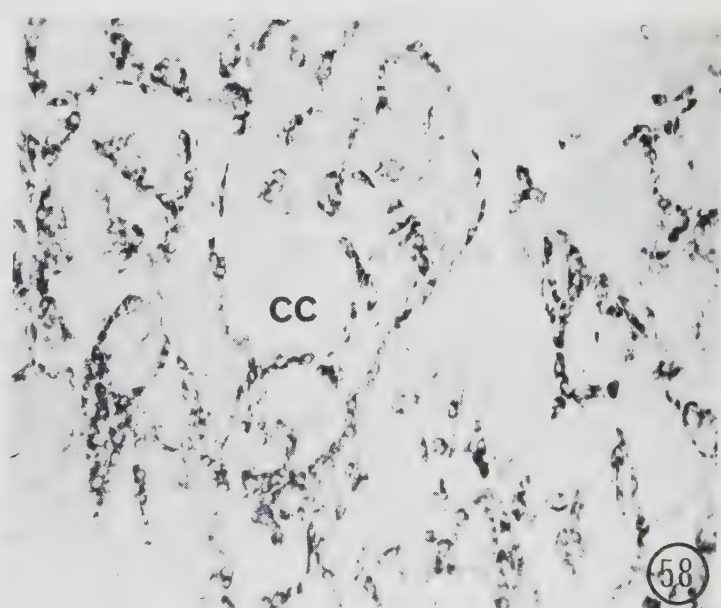
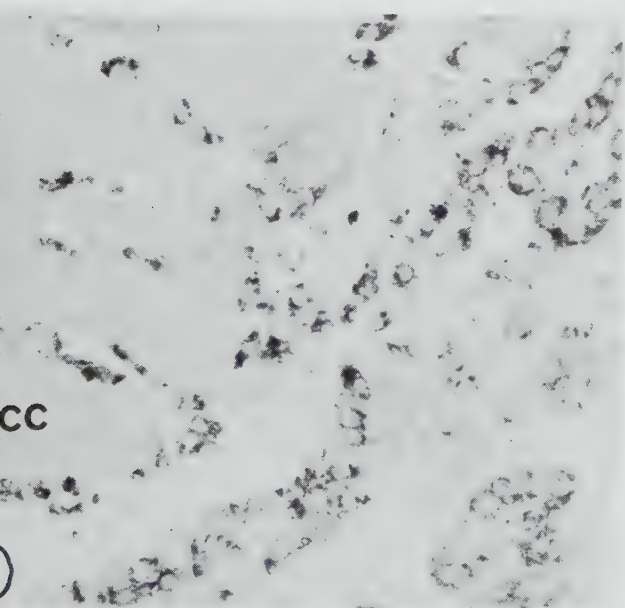
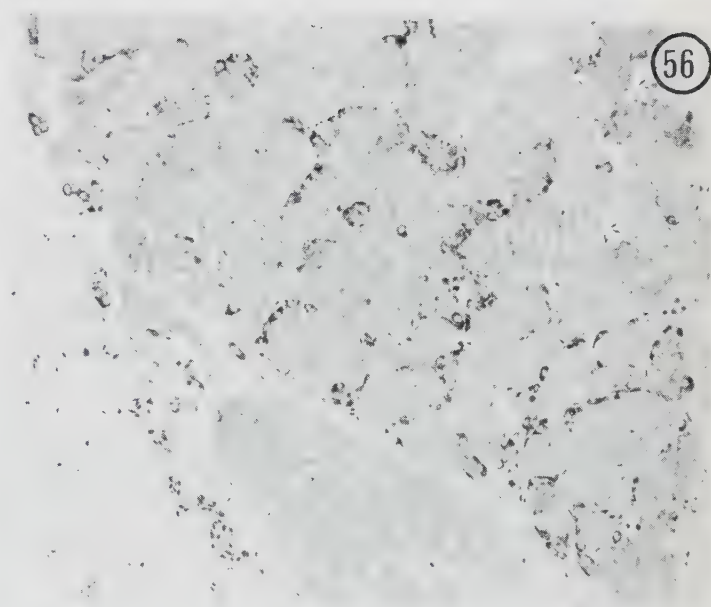
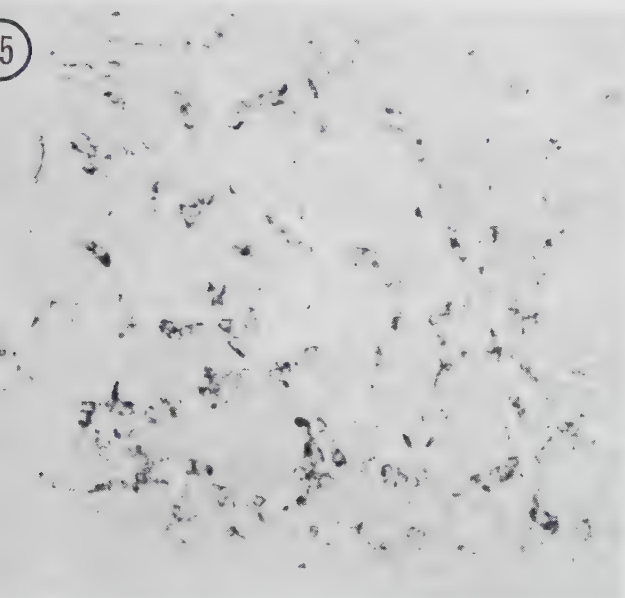
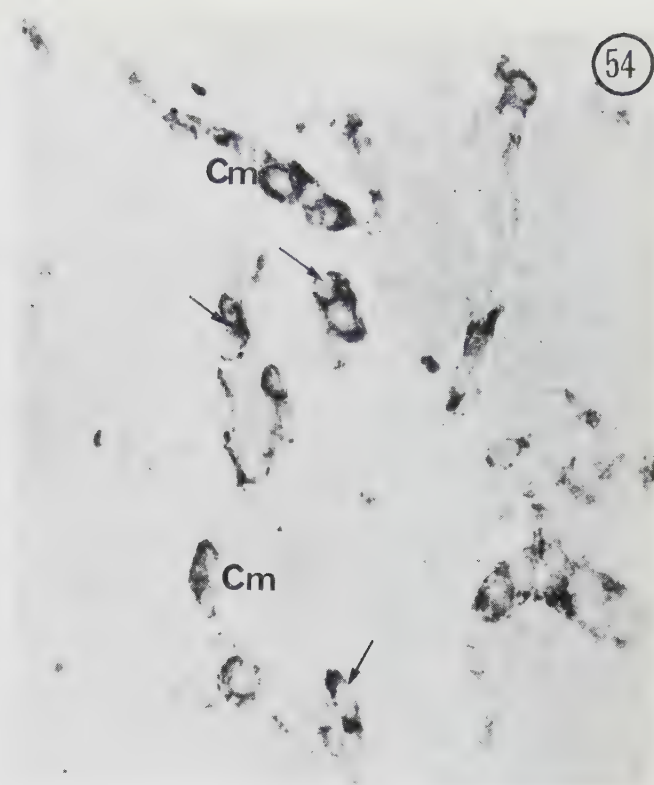
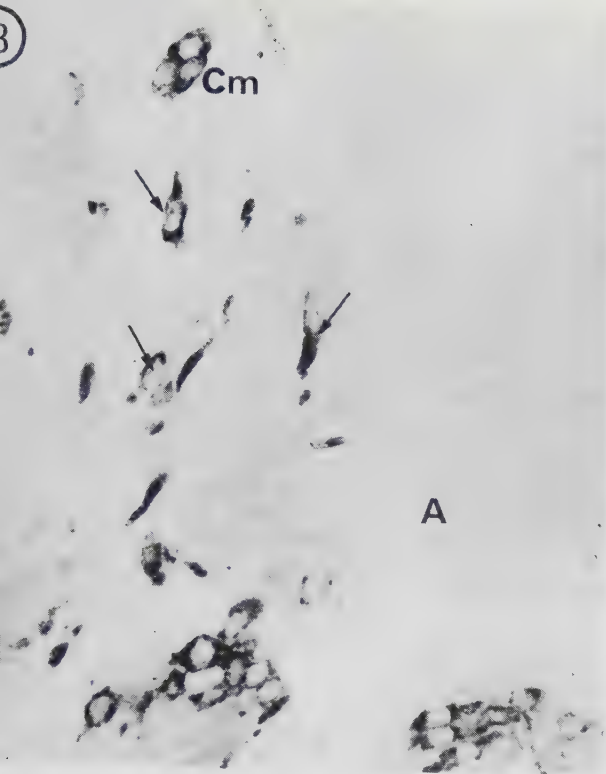
Jusqu'au 15ème jour d'incubation on peut observer de nombreuses cellules médullaires (adrénales) en périphérie de la glande dans le tissu conjonctif.

CC : cordon cortical. (x 250)

Figure 58 : Embryon 18 jours d'incubation.

La réaction s'est intensifiée dans les cellules adrénales qui se sont multipliées.

CC : cordon cortical (x 100)



avant toute pénétration dans l'ébauche corticale.

La pénétration des ébauches corticales par les cellules sympathiques commence au 6ème jour. Ces cellules sont alors observées dans le mésenchyme entourant les îlots corticaux, (Planche XVI Figure 59) et pénétrant entre eux de tous côtés. A partir du 8ème jour, le nombre des cellules adrénales augmente et la presque totalité de leurs grains est recouvert de précipité d'argent. Une même cellule contient donc des grains recouverts de précipité, donc riches en noradrénaline et des grains libres de tout précipité, ce qui pourrait traduire la présence d'adrénaline. (Planche XVI Figure 60)

A partir du 14ème jour et jusqu'à la fin de l'incubation apparaît un nombre croissant de cellules renfermant des grains dont la plupart ne sont pas recouverts de précipité. C'est donc à partir de ce stade, qu'on peut distinguer deux types de cellules adrénales :

- l'un dont la presque totalité des granules est marquée de précipité d'argent.

- l'autre type dont très peu de grains sont marqués.

On peut donc conclure qu'un type cellulaire renferme des grains riches en noradrénaline, tandis que l'autre renferme des grains riches en adrénaline.

Mais à tous les stades, on observe des cellules renfermant à la fois des grains marqués et des grains non marqués.

Il faut également préciser que :

- la quantité de précipité d'argent est variable suivant les granules.

- la taille de la granulation du précipité est également variable.

Elle peut être fine ou très grossière.

c) - Formation d'un complexe ferro-ferricyanure

Le maintien de la noradrénaline est assuré comme dans la technique précédente par une fixation au glutaraldéhyde. Le fixateur forme avec la noradrénaline un produit de condensation insoluble qui est ensuite capable de réduire le Fe^{+++} du chlorure ferrique en Fe^{++} . Ce Fe^{++} forme avec le ferricyanure de sodium un complexe ferro-ferricyanure bleu insoluble.

L'adrénaline peut également former avec le glutaraldéhyde des complexes mais ceux-ci sont solubles et sont extraits du tissu au cours de la fixation et de l'incubation.

PLANCHE XVI

PLANCHE XVI

Mise en évidence de la noradrénaline par la réaction de TRAMEZZANI sur pièces incluses en épon. Coupes ultra-fines examinées au microscope électronique.

Figure 59 : Embryon 6 jours d'incubation.

Cellule migratrice renfermant des grains dont certains sont recouverts d'un précipité plus ou moins dense.

La faible densité des grains est due au fait que ces prélèvements ne sont pas postfixés à l'acide osmique.

CO : tissu conjonctif ; G : grains de catécholamines ; N : noyau.

(x 4 000)

Figure 60 : Embryon 13 jours d'incubation.

La microphotographie est destinée à montrer qu'une cellule médullaire peut renfermer à la fois des grains marqués d'un précipité d'argent indiquant la présence de noradrénaline, et d'autres grains non marqués. (présence d'adrénaline). (x 20 000)

59

Co

G

N

60

Nous avons obtenu à l'aide de cette méthode des résultats positifs dans des glandes surrénales d'embryons de 9 jours, mais le matériel coloré avec la solution de ferricyanure de sodium-chlorure ferrique est si intensément coloré (Planche XIV Figure 52) que l'observation cytologique fine est impossible.

d) - Sel de tétrazolium à pH alcalin (HOP["]SU et MAKINEN)

Après fixation au glutaraldéhyde, les coupes sont incubées dans un milieu de Nitro BT à pH alcalin. Selon les auteurs, le complexe noradrénaline-glutaraldéhyde est capable de réduire le sel de tétrazolium et de provoquer ainsi un dépôt de formazan bleu qui visualise la présence de noradrénaline.

Malgré des essais de changements de temps de fixation, d'incubation, de concentration, nous n'avons jamais obtenu la plus légère coloration des cellules adrénales au moyen de cette méthode.

e) - Fixation par un mélange formol-bichromate (WOOD)

Dans cette méthode, le fixateur est un mélange de formol et de bichromate, il provoque donc une réaction phéochrome de l'ensemble des cellules adrénales.

La coloration des coupes par la solution éosine jaunâtre-bleu d'aniline fait apparaître des différences de teintes entre les cellules adrénales qui permettent, selon l'auteur la distinction des cellules riches en noradrénaline colorées en jaune, de celles riches en adrénaline dont le cytoplasme est brun pourpre. Les noyaux de toutes les cellules sont bleu-violacé et les nucléoles sont rouge-brillant.

Cette méthode appliquée à notre matériel embryonnaire nous a donné d'excellents résultats. Elle nous a servi par ailleurs à mettre en évidence la topographie de la glande aux stades précoces de l'organogenèse. (Planche I Figures 1, 2, 3 et 4)

Dès le 6ème jour d'incubation, la réaction est positive au niveau de cellules sympathiques migratrices situées le long des parois de l'aorte. (Planche II Figures 5 et 6) leur couleur jaune permet de les repérer facilement au milieu des fibres conjonctives bleu intense. On les observe dis-

tinctement dans le mésenchyme entourant l'ébauche corticale (Planche I Figure 3) et pénétrant de toutes parts entre les cordons corticaux. Cette coloration jaune est observée dans la suite du développement au niveau du cytoplasme de toutes les cellules adrénales et les résultats obtenus concernant leur localisation sont étroitement comparables à ceux de la technique de TRAMEZZANI.

La couleur brune-pourpre n'est obtenue dans quelques cellules qu'à partir du 18ème jour de l'incubation. Il ya toutefois à partir du 14ème jour de nombreuses cellules qui présentent des colorations variables du jaune au brun.

La technique de coloration des coupes, provenant du même matériel fixé par le mélange formol-bichromate, par du Giemsa dilué ne reproduit pas les excellents résultats de la méthode précédente. La coloration de notre tissu embryonnaire est trop intense et l'observation est difficile.

f) - Fixation au glutaraldéhyde. Réduction du bichromate de potassium (WOOD et BARNETT 1964)

Selon les auteurs, l'incubation des coupes dans du bichromate de potassium à pH 6,5 produit une réaction phéochrome de toutes les cellules médullosurrénales, mais à pH 4,1 seules les cellules contenant de la noradrénaline présentent cette réaction.

Cette méthode nous a donné les mêmes résultats que la réaction phéochrome : une réaction positive apparaît au 7ème jour dans des cellules adrénales situées entre les cordons corticaux. Les colorations obtenues varient du jaune clair au jaune foncé tout au long du développement.

g) - Fixation au glutaraldéhyde. Réduction d'acide osmique
(COUPLAND 1964)

Après fixation par le glutaraldéhyde et passage dans l'acide osmique, une grande quantité d'osmium est liée aux cellules qui stockent la noradrénaline.

En microscopie optique : (coupes à la congélation avant le passage dans l'acide osmique) les cellules renfermant de la noradrénaline sont brunes, tandis que celles qui stockent de l'adrénaline sont incolores.

Nous avons identifié la présence de noradrénaline à partir du 8ème jour dans des cellules adrénales disposées en files entre les cordons corticaux, la trame de répartition de ces cellules est la même que celle donnée par les autres techniques. L'intensité de la réaction est inférieure à celle que donne la réaction de TRAMEZZANI.

h) - Fixation au formol. Réaction de fluorescence
(ERANKÖ)

La fluorescence des catécholamines peut être induite par des solutions de formaldéhyde. ERANKÖ (1951, 1952) a noté qu'après fixation au formol quelques cellules de la médullosurrénale montrent une fluorescence verdâtre. Au moyen de techniques de microdissection et de chromatographie, ERANKÖ (1954) a confirmé que les flots fluorescents contiennent de la noradrénaline.

Au microscope à fluorescence, en lumière ultraviolette, les cellules contenant de la noradrénaline montre une fluorescence jaune-verdâtre. Celle-ci est observée à partir du 7ème jour, mais l'ensemble de la glande est légèrement fluorescent et il existe une diffusion importante autour des flots de cellules médullaires. Aussi nous avons abandonné cette technique au profit de la réaction aux vapeurs de formaldéhyde.

i) - Réaction de fluorescence aux vapeurs de formaldéhyde

Nous avons essayé d'appliquer cette technique sur coupes au cryostat des territoires des ébauches corticales d'embryons du 5ème jour au 8ème jour. Cette technique étant d'une grande sensibilité (FALCK et TORP 1962) nous avons cherché à vérifier l'existence de la différenciation des cellules sympathiques migratrices.

Des cellules de grande taille, de fluorescence jaune-verdâtre sont repérées au 5ème jour dans le mésenchyme de la région des ébauches corticales.

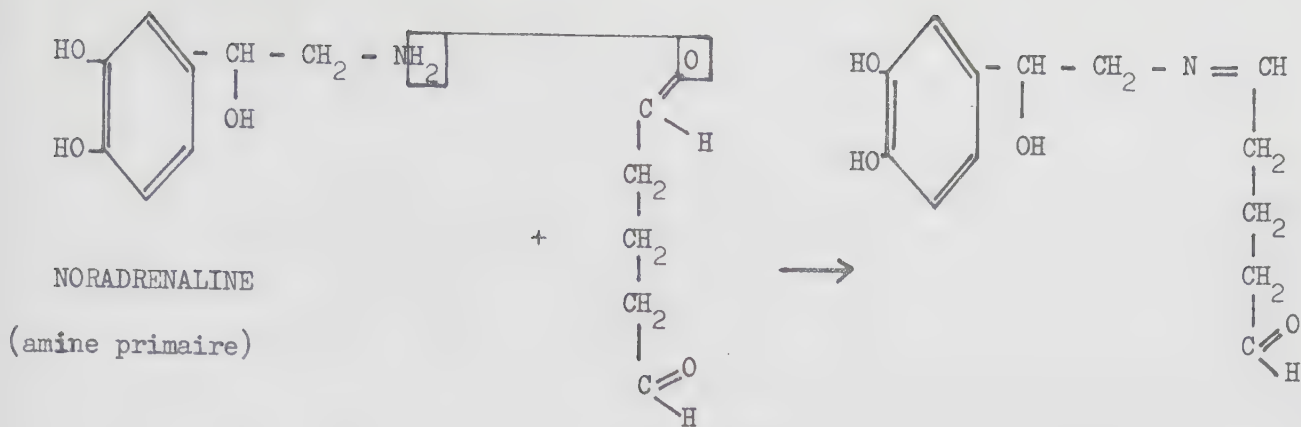
Au 6ème jour, de nombreuses cellules dont le cytoplasme est très fluorescent, pénètrent en files dans l'ébauche corticale et au 8ème jour, la fluorescence jaune-verdâtre est devenue très intense au niveau de toutes les cellules adrénales, les cellules corticales apparaissent légèrement verdâtres.

C) - DISCUSSION

1°) - L'étude des caractères histochimiques des cellules adrénales a confirmé les résultats ultrastructuraux sur la différenciation extrêmement précoce de ces cellules. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une présence de noradrénaline par trois techniques histochimiques différentes (technique de TRAMEZZANI ; technique de WOOD et technique de fluorescence aux vapeurs de formaldéhyde de FALCK et Coll. 1962) dans des cellules sympathiques migratrices au 5ème jour de l'incubation. Ce résultat positif a été obtenu plus précocement que par les autres auteurs cités dans l'introduction. Il est dû à l'utilisation de techniques plus sensibles que celles qu'ils avaient employées. Notre résultat concorde avec celui d'ENEMAR, FALCK et HÅKANSON (1965) qui ont utilisé une technique de fluorescence aux vapeurs de formaldéhyde sur des tissus lyophilisés ; ils ont étudié l'apparition de la noradrénaline dans le système nerveux sympathique de l'embryon de Poulet, et l'ont identifiée dans la chaîne sympathique à un stade extrêmement précoce (embryon de 3 jours et demi d'incubation). Ils l'ont également identifiée dans des cellules sympathiques situées dans le plexus aortique et entre les bourgeons corticaux.

TRAMEZZANI, CHIOCCHIO et WASSERMANN (1964) ont tenté d'expliquer le mécanisme du maintien de la noradrénaline après fixation par le glutaraldéhyde.

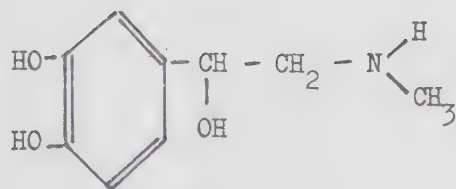
Selon ces auteurs le glutaraldéhyde formerait avec la noradrénaline un complexe insoluble du type base de Schiff possédant un groupement aldéhyde libre qui provoquerait la réduction d'argent ammoniacal. L'adrénaline qui a un groupement méthyle terminal ne réagirait pas avec le glutaraldéhyde et serait solubilisée au cours de la fixation et des lavages.



GLUTARALDEHYDE

COMPLEXE TYPE

BASE de SCHIFF

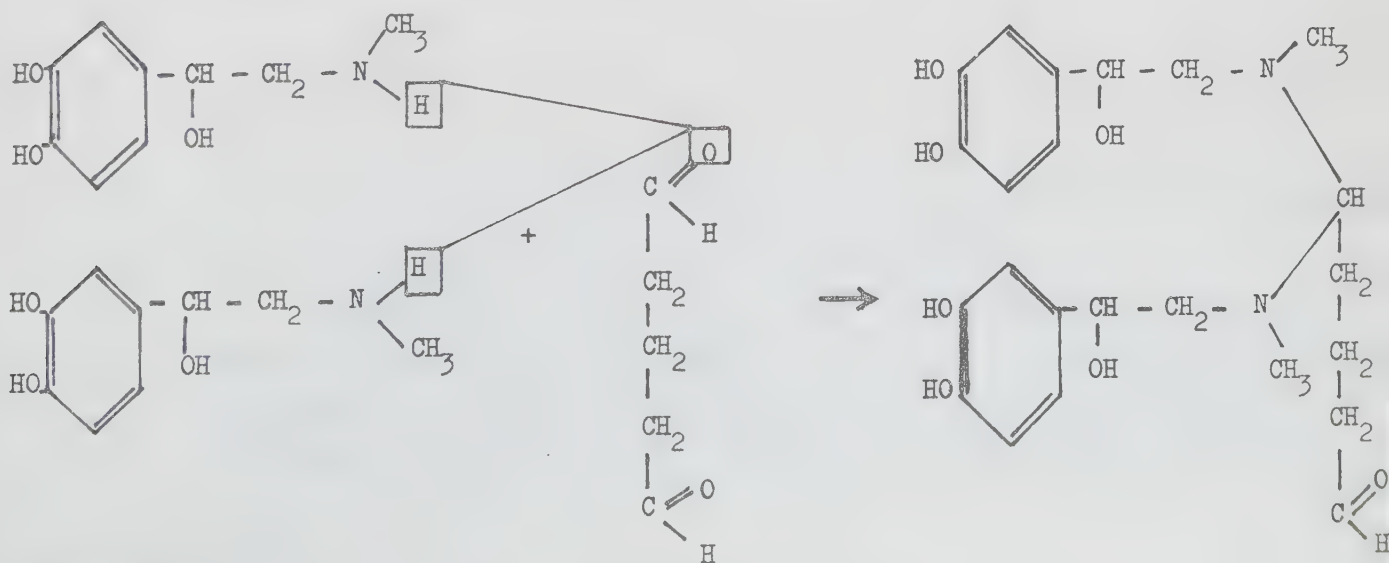


ADRENALINE

(amine secondaire)

HOPSU et MAKINEN (1966) sont d'accord avec TRAMEZZANI et Coll. sur la formation d'un complexe glutaraldéhyde-noradrénaline mais ils pensent que la réduction de l'argent n'est pas dû au groupement aldéhyde libre, en effet dans des surrénales fixées par le glutaraldéhyde, des cellules riches en noradrénaline ne sont pas colorées par le réactif de Schiff.

VITRY (1966) souligne que théoriquement le glutaraldéhyde peut former un complexe avec l'adrénaline.



ADRENALINE

GLUTARALDEHYDE

D'autre part, CANNATA, CHIOCCHIO et TRAMEZZANI (1968) ont démontré la spécificité de cette technique pour la noradrénaline, la mélanine et les lipofuscines et ont confirmé qu'avec l'adrénaline cette réaction au nitrate d'argent ammoniacal était négative.

Les auteurs ont apporté un argument à cette hypothèse en utilisant des tissus frais coupés à la congélation : si les coupes provenant de ces tissus sont introduites dans une solution d'argent ammoniacal, les cellules contenant l'adrénaline et la noradrénaline réduisent l'argent. (réaction argentaffine)

Si les coupes de tissu frais sont gardées dans l'eau distillée, les catécholamines sont solubilisées et on n'observe pas la réduction du nitrate d'argent. Si les coupes sont gardées dans la solution de glutaraldéhyde, le fixateur se combine à la noradrénaline pour former un composé insoluble tandis que l'adrénaline est solubilisée. A l'étape de lavage, l'adrénaline disparaît des coupes, tandis que le composé formé par la condensation de la noradrénaline et du glutaraldéhyde subsiste et réduit les solutions d'argent.

Mais VITRY (1966) a obtenu *in vitro*, la formation d'un complexe adrénaline-glutaraldéhyde. Le glutaraldéhyde n'a pas de spécificité vis à vis de la noradrénaline seule et maintient l'adrénaline et la noradrénaline dans les tissus. "Le fait que nous ayons, après lavage prolongé de pièces fixées à la glutaraldéhyde, la catégorie cellulaire riche en noradrénaline seule révélée, est très certainement lié à des différences, selon les cellules, dans la concentration en amines ou dans la liaison à un support".

Le glutaraldéhyde interviendrait donc "plus particulièrement sur la liaison des amines à leur support".

ERANKÖ (1952) avait observé dans certaines cellules de la médullosurrénale une fluorescence verte induite par la formaldéhyde et avait démontré que ces cellules contenaient une très forte concentration en noradrénaline. Puis plusieurs auteurs ont découvert que la noradrénaline formait un composé très fluorescent en lumière U.V., avec la formaldéhyde.

ERANKÖ (1961), FALCK et TORP (1961), FALCK, HILLARP, THIEME et TORP (1962) ont observé que les catécholamines deviennent intensément fluorescentes en lumière U.V. dans des tissus exposés aux vapeurs de formaldéhyde, quand la réaction se passe dans une couche de protéines sèches. FALCK et TORP (1962),

CARLSSON, FALCK et HILLARP (1962) ont appliqué cette technique à des tissus lyophilisés et ont ainsi pu localiser à l'échelon cellulaire les monoamines du système nerveux.

Plusieurs auteurs dont HAMBERGER et NORBERG (1964) ont essayé d'adapter cette technique aux coupes au cryostat. Etant donné que dans notre travail, une grande partie des techniques histochimiques était effectuée sur des coupes au cryostat, nous avons choisi cette méthode assez rapide pour identifier la noradrénaline dans les stades précoces du développement.

Le résultat positif obtenu au 5ème jour, au niveau de cellules sympathiques migratrices confirme exactement celui obtenu par la technique de TRAMEZZANI.

2°) - La comparaison des résultats obtenus au même stade embryonnaire, d'une part après action du bichromate-chromate pour la mise en évidence de l'ensemble des catécholamines, et d'autre part, après les diverses réactions spécifiques de la noradrénaline, aboutit à la conclusion que tout au long du développement de la glande surrénale, la noradrénaline est la catécholamine la plus abondante. SHEPHERD et WEST (1951) ont dosé les catécholamines de la médullosurrénale du Poulet et ont trouvé que 60 à 80 % d'entre elles étaient constituées par de la noradrénaline. ERANKÖ (1957) trouve qu'un tiers seulement de l'ensemble des catécholamines est représenté par de la noradrénaline.

Dans les stades précoces et jusqu'au 16ème jour d'incubation, toutes les cellules médullaires sont colorées par les deux méthodes, on peut donc en conclure que toutes les cellules médullaires renferment de la noradrénaline. L'application de la technique de TRAMEZZANI à la microscopie électronique a montré que dès le 6ème jour, certains grains des cellules médullaires ne sont pas recouverts de précipité d'argent : ils peuvent donc contenir de l'adrénaline. C'est à partir du 14ème jour qu'on distingue nettement deux types de cellules : l'un riche en noradrénaline, l'autre riche en adrénaline, mais le nombre de cellules à contenu noradrénalinique est très supérieur à celui des cellules renfermant de l'adrénaline. Ces dernières n'ont pas de localisation préférentielle et sont disséminées dans tous les flots de cellules médullaires périphériques et centraux. Nous n'avons pas retrouvé la répartition indiquée par SIVARAM (1965) qui observe plus de cellules riches en adrénaline dans la couche sous capsulaire que dans les autres flots.

Malgré l'augmentation de l'adrénaline en fin d'incubation, la noradré-

naline prédomine dans la glande embryonnaire tout au long du développement.

Une augmentation brusque de la proportion d'adrénaline a été notée entre 22 et 24 jours chez le fœtus de Lapin, entre 18 jours $\frac{1}{2}$ et 19 jours $\frac{1}{2}$ chez le fœtus de Rat. (ROFFI, CHEOUX, COHEN et JOST 1965)

Chez l'embryon de Rat, HOKFELT (1951) a démontré que 4 jours avant la naissance, la médullosurrénale contient 20 % d'adrénaline et 80 % de noradrénaline. La veille de la naissance, le taux d'adrénaline est de 43 %. Il y a donc une augmentation du contenu d'adrénaline avec l'âge de l'embryon et immédiatement avant la naissance.

3°) - La technique de TRAMEZZANI qui a l'avantage d'être applicable à la microscopie électronique, nous a fourni un argument en faveur de la coexistence de grains de nature chimique différente dans la même cellule.

En effet, on observe dans la même cellule des grains recouverts de précipité d'argent, donc riches en noradrénaline et des grains libres de tout précipité, donc riches en adrénaline. Il semblerait donc que toutes les cellules adrénales possèdent le système enzymatique de méthylation de la noradrénaline en adrénaline.

Ces faits seraient donc en faveur de la théorie uniciste de PICARD. Les travaux biochimiques de PICARD et VITRY (1964) ont montré que les cellules à noradrénaline ne contiennent pas exclusivement cette catécholamine, mais qu'elles renferment également de l'adrénaline. Toutes les cellules sont capables de transformer la noradrénaline en adrénaline, mais les cellules à adrénaline ont un rendement de méthylation supérieur à celui des cellules à noradrénaline.

ETUDE EXPERIMENTALE
PORTANT SUR
LES CELLULES CORTICALES

I - ACTION DE L'ACTH

A) - INTRODUCTION

L'activité fonctionnelle du cortex surrénal est sous l'influence de facteurs hypothalamo-hypophysaires.

Les corrélations hypophyso-surrénaliennes existent déjà au cours de la vie foetale : les hypophysectomies du fœtus de Rat conduisent à une atrophie de la surrénale foetale. (KITCHELL et WELLS 1952)

Chez l'embryon de Poulet, FUGO (1940), CASE (1953) par décapitation à des stades précoces, obtiennent une diminution du poids des embryons et du poids des surrénales.

Par décapitation de fœtus de Rat, JOST (1966) obtient non seulement une atrophie de la surrénale foetale, mais également une baisse du taux de glycogène du foie, ce taux redevient normal si on injecte du cortisol ou de l'ACTH aux fœtus.

L'ACTH d'origine foetale joue donc un rôle important dans la stéroïdogénèse des surrénales foetales.

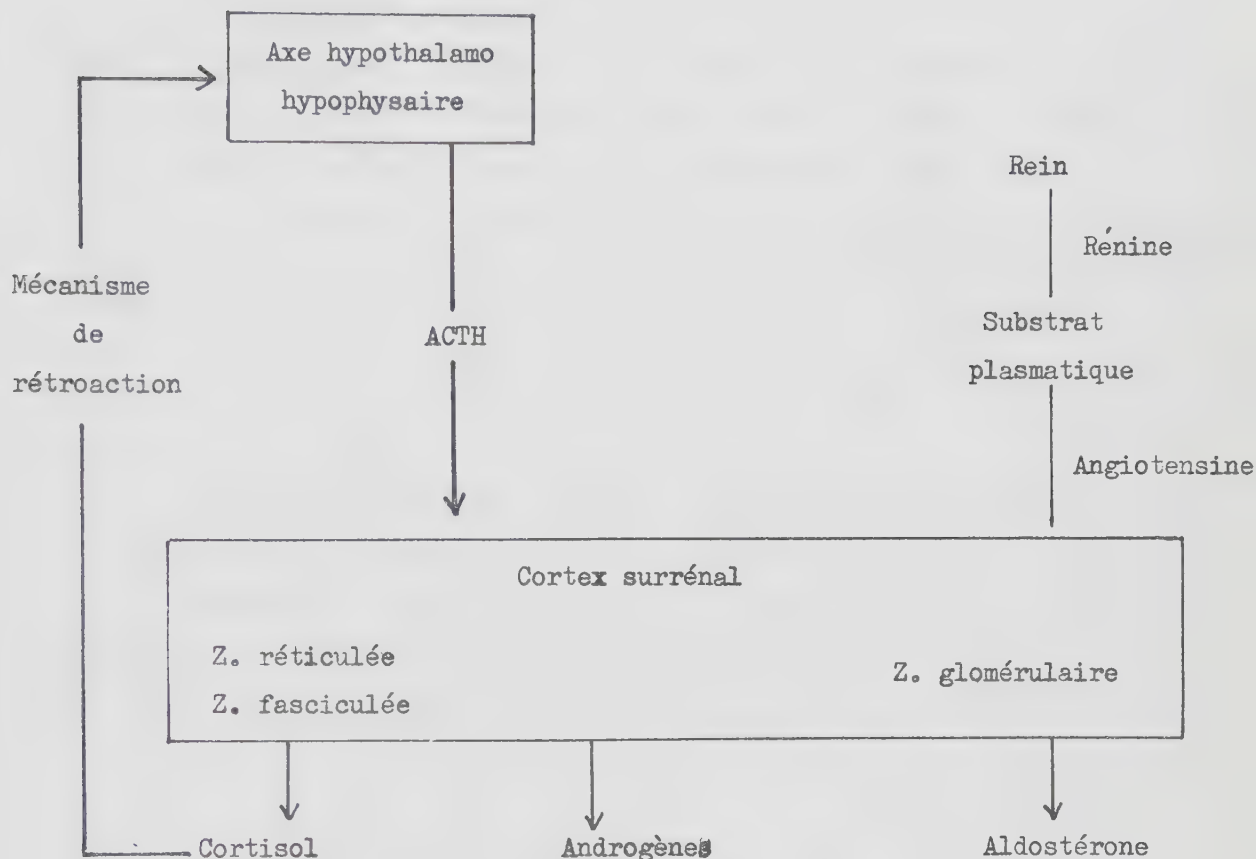
L'ACTH ou hormone adrénocorticotrope est produite par le lobe antérieur de l'hypophyse, elle est libérée sous l'influence d'une hormone hypothalamique le CRF (corticotropin releasing factor). L'ACTH stimule la sécrétion du cortisol et des androgènes. Le taux de cortisol circulant est maintenu par un mécanisme de rétroaction. Si ce taux s'élève, la sécrétion d'ACTH est inhibée ; si ce taux diminue, la sécrétion antéhypophysaire est accrue.

Le mécanisme de la sécrétion d'aldostérone est indépendant de l'hypophyse.

Chez le Rat, la corticostérone est le principal stéroïde terminal de la biosynthèse des stéroïdes surrénaliens et chez cette espèce, la sécrétion d'ACTH est freinée par la corticostérone. Donc, l'inhibition d'une étape dans la voie de la biosynthèse de la corticostérone conduit à augmenter la sécrétion d'ACTH (DEXTER et Coll. 1967) et par conséquent la synthèse des précurseurs de la corticostérone.

Chez les Oiseaux, nous avons vu que différents auteurs ont mis en évidence lors d'analyses des stéroïdes surrénaliens, de la corticostérone ; le cortisol n'a été trouvé qu'à l'état de traces. Il se pourrait donc que

comme chez le Rat, la corticostérone agisse sur la sécrétion d'ACTH.



SCHEMA DE L'AXE HYPOPHYSOSURRENALIEN CHEZ L'HOMME

Les travaux concernant le mode d'action de l'ACTH ont conduit à différentes hypothèses qui ont été détaillées par MAC KERN (1968) :

- l'ACTH accélère une réaction enzymatique spécifique de la stéroïdogénèse.

- l'ACTH peut activer la glucose 6 phosphate déshydrogénase surrénalienne et ainsi augmenter le taux de réduction du NADP +, le NADPH formé peut coupler les réactions des stéroïdes qui nécessitent ce nucléotide réduit, stimulant ainsi la synthèse des stéroïdes.

- l'ACTH stimule une augmentation de précurseurs des stéroïdes,

probablement la Δ 5 prégnenolone.

De nombreux travaux ont déjà été entrepris afin de tenter de relier les caractères morphologiques aux activités fonctionnelles du cortex surrénal.

L'ultrastructure du cortex surrénal stimulé par l'ACTH a été étudiée chez l'Homme (CARR 1961), chez le Rat [LEVER (1956), BRAUNSTEINER et Coll. (1955), BOROWICZ (1965), IDELMAN (1966), SABATINI, DE ROBERTIS et BLEICHMAR (1962), SCHWARZ, MERKER et SUCHOWSKY (1962), YAMORI, MATSUURA et SAKAMOTO (1961)], chez le Hamster (YATES 1965), chez la Poule (KJAERHEIM 1968).

Chez l'embryon de Poulet la seule étude ultrastructurale des cellules corticales dans des conditions expérimentales, est celle de MESS et STRAZNICKY (1970) chez des embryons décapités et recevant ultérieurement de l'ACTH. La décapitation provoque un retard de la différenciation ultrastructurale des cellules corticales du 8ème jour au 17ème jour d'incubation, ce retard est compensé si on injecte de l'ACTH.

Les auteurs concluent que l'ACTH est nécessaire à la différenciation et qu'elle induit le démarrage de la stéroïdogénèse.

Après avoir étudié l'histogénèse des cellules corticales, nous avons essayé de déterminer à quelle époque de la vie embryonnaire ces cellules répondaient à une stimulation par l'ACTH, par des modifications morphologiques et histochimiques, prouvant leur maturité fonctionnelle.

B) - MATERIEL ET TECHNIQUES

Nous avons étudié l'action de l'ACTH sur des embryons de 7 jours à 20 jours, des Poussins âgés de 1 à 8 jours et des Poulets de 1 mois.

Nous avons utilisé en injections sous-cutanées :

- l'ACTH purifiée des laboratoires ENDOPANCRINE (cortrophine purifiée lyophilisée).

- l'ACTH 25 CHOAY.

- l'ACTH 50 CHOAY.

L'ACTH des laboratoires ENDOPANCRINE a également été administrée par voie sanguine chez certains embryons de 11 à 14 jours par injection dans un vaisseau chorio-allantoïdien, à l'aide d'une microaiguille de verre et d'une micropompe. Ces embryons ne recevaient qu'une seule injection de 3 U.I.

Les embryons de 7 jours à 11 jours d'incubation ont reçu 2 U.I. d'ACTH (nouvelles unités standard internationales sous-cutanées) par jour, pendant

1 à 3 jours, la quantité d'ACTH correspondant à cette dose étant déposée sur la membrane chorio-allantoïdienne. (les dilutions sont faites avec du sérum physiologique à 9/1000).

Chez les embryons de 12 jours à 20 jours, nous avons effectué des injections de 3 U.I. par jour pendant 1 à 3 jours.

Les Poussins ont reçu 10 U.I. par injection et les Poulets 15 U.I. par injection pendant 4 ou 5 jours.

Les prélèvements des glandes surrénales des embryons et des Poussins expérimentaux sont effectués 3 à 4 heures après la dernière injection.

Les fixations ont été faites en vue de :

- l'étude histologique classique
- l'étude en microscopie électronique
- l'étude histochimique. Pour cette dernière partie, nous avons effectué les recherches de mise en évidence des lipides neutres (glycérides), de cholestérol, d'acide ascorbique et de la $\Delta 5 - 3 \beta$ hydroxystéroïdo-déshydrogénase, selon les méthodes exposées dans le chapitre MATERIEL ET TECHNIQUES.

C) - RESULTATS

1°) - MICROSCOPIE OPTIQUE

L'examen des coupes colorées par les techniques d'histologie classique révèle que chez tous les embryons et les Poussins expérimentaux, le tissu cortical est hypertrophié. Le noyau des cellules corticales est de forme régulière, arrondie, d'aspect très clair : il renferme des nucléoles bien visibles.

Modifications des réactions histochimiques

- Lipides neutres (glycérides)

Les résultats obtenus peuvent être présentés en 3 groupes.

a) - Chez les embryons de 8, 9 et 10 jours ayant reçu des

injections d' ACTH depuis le 7ème jour, les réactions à l'Oil Red O, au Fettrot 7 B, au noir Soudan B après fixation selon ELFTMAN sont intensifiées. Ce fait est surtout visible à 9 jours.

b) - En ce qui concerne l'abondance des inclusions lipidiques et l'intensité des réactions histochimiques, il est difficile de trouver une différence au stade 11-12 jours entre les embryons ayant reçu 2 ou 3 injections d'ACTH et les embryons témoins. Seuls, quelques embryons expérimentaux ont présenté des réactions plus intenses.

c) - A partir du 13ème jour, les injections d'ACTH provoquent une déplétion lipidique de tous les cordons corticaux.

L'intensité des réactions de mise en évidence des lipides neutres (Oil Red O, Fettrot 7 B) est légèrement atténuée après une injection, très nettement diminuée après 3 injections (Planche XVIII Figures 66 et 67).

Les inclusions lipidiques dont la disposition au pôle basal des cellules déterminait une bordure lipidique entourant chaque flot cortical central, sont remplacées par de très nombreuses petites gouttelettes. Ces dernières ont tendance à disparaître après 3 ou 4 injections. (Planche XVIII Figure 69)

Chez les Poussins, le traitement par l'ACTH provoque une déplétion extrêmement sévère du matériel lipidique. (Planche XVIII Figure 71)

- Cholestérol

Les premiers cristaux du complexe cholestérol-digitonine apparaissent au 8ème jour d'incubation chez les embryons expérimentaux comme chez les embryons témoins. Parallèlement à l'intensification des réactions de mise en évidence des lipides, on observe un plus grand nombre de cristaux de cholestérol-digitonine chez les embryons expérimentaux de 9 et 10 jours.

Au 13ème jour, il y a une très nette diminution de ce nombre chez les embryons traités par l'ACTH.

A partir du 15ème jour, la réaction à la digitonine ne fait apparaître que de rares cristaux en lumière polarisée, la déplétion du cholestérol est donc presque totale.

- Acide ascorbique

Il est mis en évidence au 9ème jour chez les embryons expérimentaux et chez les embryons témoins. On n'observe aucune modification de la réaction aux 10ème, 11ème et 12ème jours, mais chez les embryons expérimentaux de 14 jours, le précipité d'argent qui visualise la présence d'acide ascorbique est nettement moins abondant que chez les embryons témoins.

- Activité enzymatique $\Delta 5 - 3 \beta$ hydroxystéroïdodéshydrogénase

La réaction de mise en évidence de cette activité enzymatique est légèrement plus intense tout au long du développement, chez les embryons ayant reçu 2 ou 3 injections d'ACTH que chez les embryons témoins, ce qui traduit donc une augmentation de l'activité de la $\Delta 5 - 3 \beta$ hydroxystéroïdodéshydrogénase.

2°) - MODIFICATIONS ULTRASTRUCTURALES

On retrouve à l'échelle ultrastructurale, l'hypertrophie des cellules corticales, qui avait été observée en microscopie optique. On note également une augmentation de la taille des noyaux (Planche XVII Figure 61) et des nucléoles, des modifications au niveau des liposomes, des mitochondries, du réticulum endoplasmique lisse, de l'appareil de Golgi et des ribosomes.

a) - Chez les embryons expérimentaux de 8 et 9 jours, les cellules corticales contiennent de petits liposomes en plus grand nombre que chez les témoins, et une très grande quantité de ribosomes.

b) - Au 11ème jour d'incubation, des images de mitoses sont fréquemment observées chez les embryons expérimentaux. Les mitochondries des cellules corticales ont une matrice plus dense que le cytoplasme (Planche XVII Figure 62). Parfois on y observe un regroupement de plusieurs crêtes parallèles, qui détermine un petit faisceau. Chez les embryons normaux, l'augmentation de densité mitochondriale n'est observée qu'aux 14ème et 15ème jours.

PLANCHE XVII

PLANCHE XVII

Figure 61 : Embryon 14 jours d'incubation. 3 injections d'ACTH 2 U.I. par injection.

Cellules corticales. On observe une augmentation de la taille du noyau des cellules par rapport aux témoins. Le cytoplasme contient peu d'inclusions lipidiques, ces dernières sont par ailleurs de petite taille et de faible densité.

Li : liposome ; M : mitochondrie ; N : noyau. (x 4 000)

Figure 62 : Embryon 11 jours d'incubation. 2 injections d'ACTH 2 U.I. par injection.

Mitochondries de forme très irrégulière dont la matrice est densifiée. Dans le cytoplasme on observe de nombreux éléments du réticulum endoplasmique lisse (—) dont certains entourent les mitochondries.

Li : liposome ; M : mitochondrie. (x 12 000)

Figure 63 : Poussin 2 jours. 2 injections d'ACTH 10 U.I. par injection.

Mitochondrie à crêtes tubulaires dont la matrice contient des grains et des granules denses aux électrons. Certains grains apparaissent hétérogènes (—) et sont constitués par du matériel granulaire.

M : mitochondrie. (x 22 000)

Figure 64 : Poussin 1 mois. 5 injections d'ACTH 10 U.I. par injection.

Mitochondries à crêtes tubulaires dilatées, la matrice apparaît homogène dans sa région centrale, les crêtes tubulaires sont refoulées en périphérie.

M : mitochondrie. (x 20 000)

Figure 65 : Poussin 1 mois. 5 injections d'ACTH 10 U.I. par injection.

Mitochondries présentant le même aspect que précédemment. On observe en outre deux enclaves lipidiques l'une dense et l'autre très claire. Les éléments du réticulum endoplasmique lisse (—) entourent les mitochondries.

Li : liposome ; M : mitochondrie. (x 18 000)

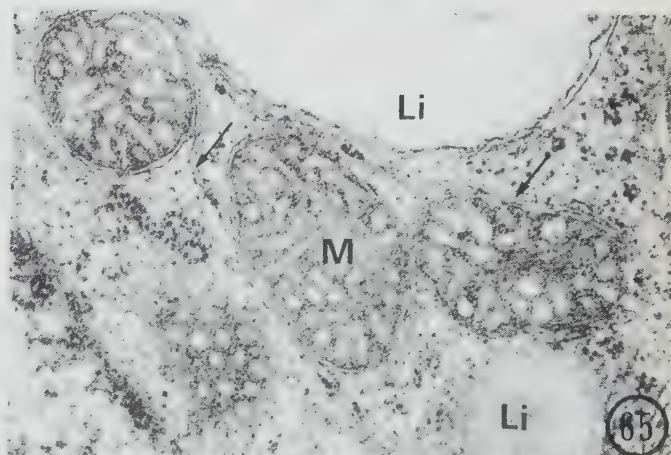
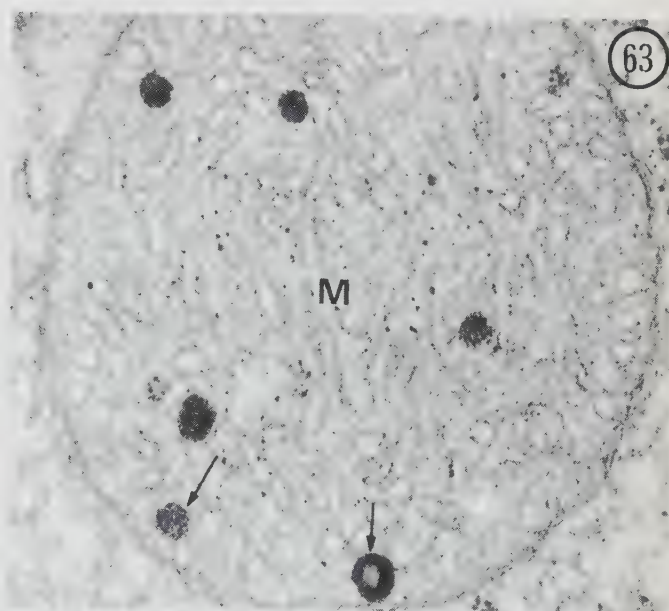
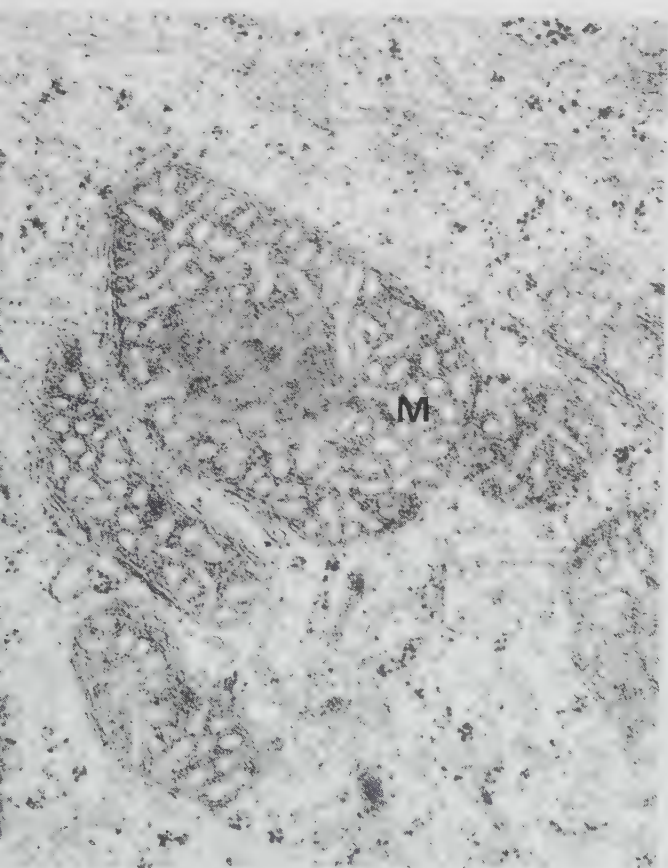
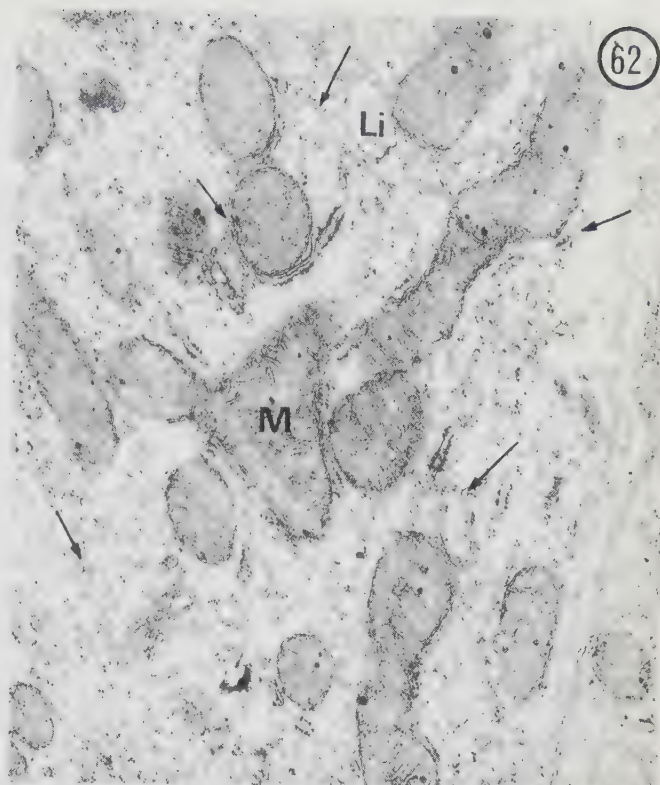
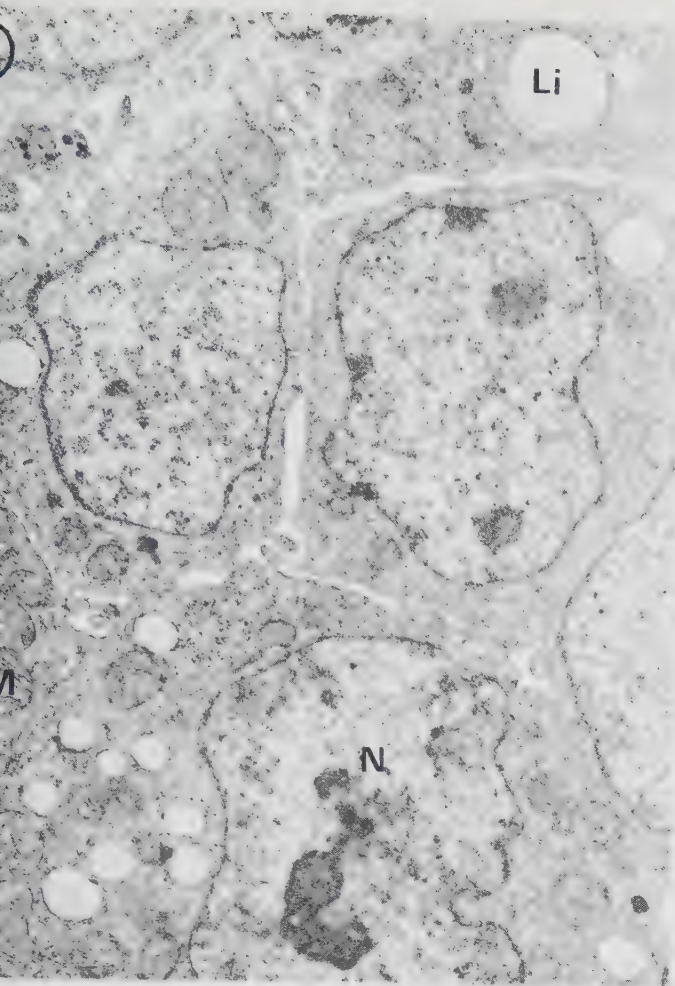


PLANCHE XVIII

PLANCHE XVIII

Figure 66 : Embryon 14 jours d'incubation. 2 injections d'ACTH 2 U.I. par injection. Coupe au cryostat coloration Oil Red O. Les inclusions lipidiques situées au pôle basal des cellules ont disparu.
CC : cordon cortical. (x 63)

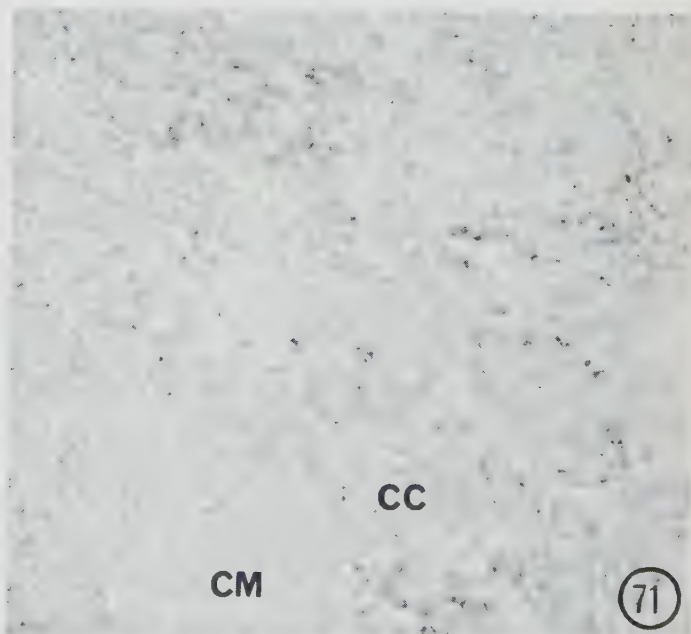
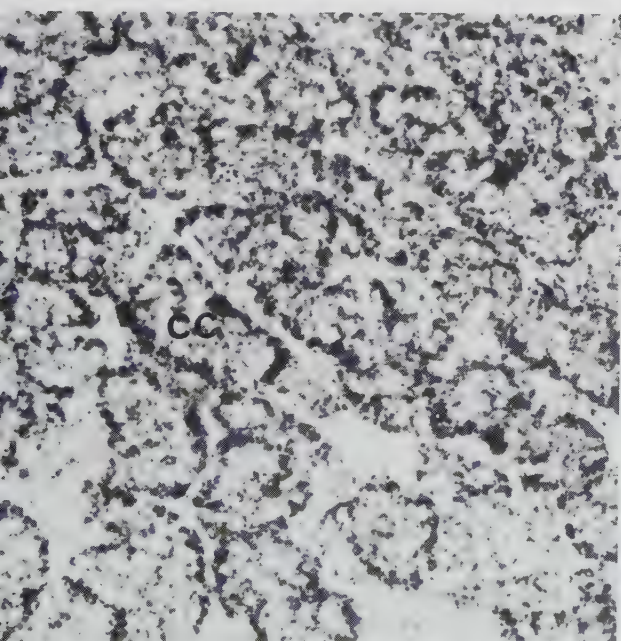
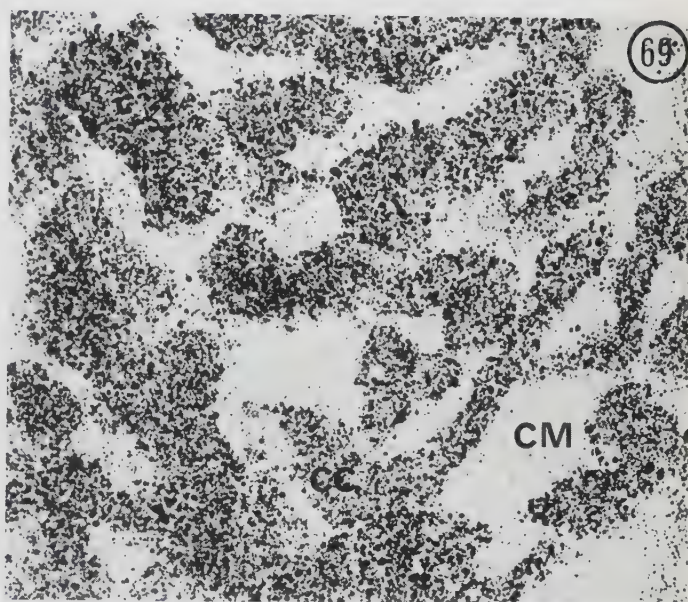
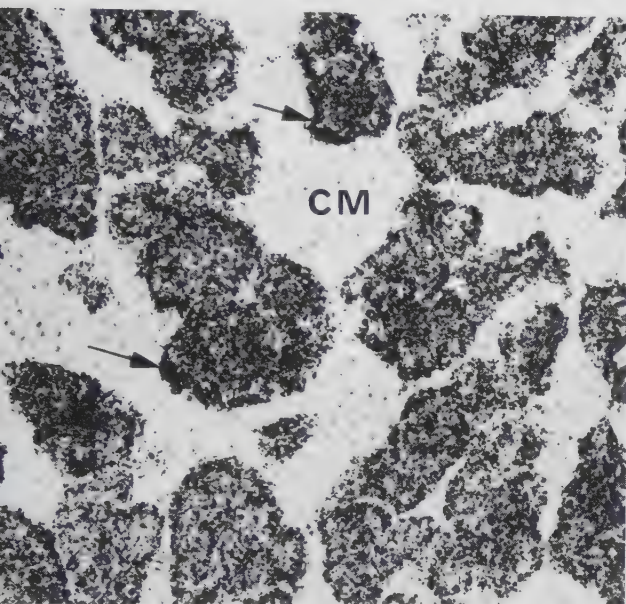
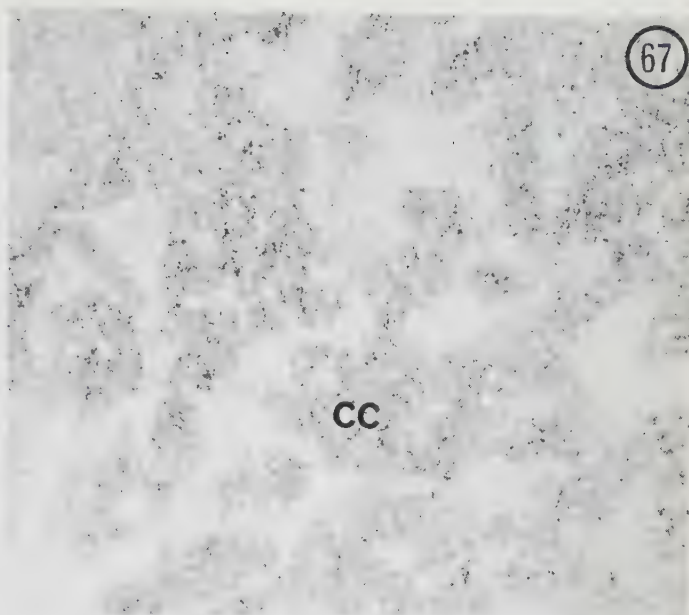
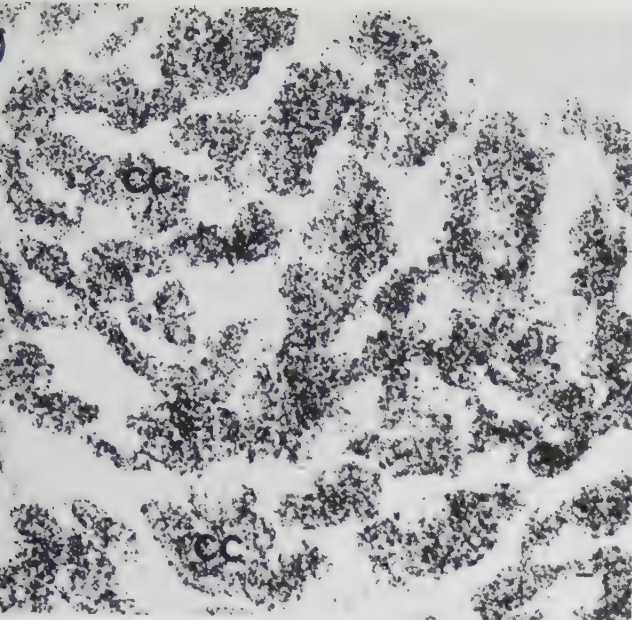
Figure 67 : Embryon 15 jours d'incubation. 3 injections d'ACTH 2 U.I. par injection. Coupe au cryostat coloration Oil Red O. On observe une déplétion importante du matériel lipidique dont il ne reste plus que de très fines gouttelettes.
CC : cordon cortical. (x 63)

Figure 68 : Poussin 3 jours. Témoin. Coupe au cryostat coloration Oil Red O. Les cordons corticaux renferment un abondant matériel lipidique. On observe en périphérie des cordons corticaux un liseré lipidique très dense (→).
CM : cellules médullaires. (x 160)

Figure 69 : Embryon 16 jours d'incubation. 3 injections d'ACTH 2 U.I. par injection. Coupe au cryostat coloration Oil Red O. Déplétion et dispersion du matériel lipidique.
CC : cordon cortical ; CM : cellules médullaires. (x 160)

Figure 70 : Embryon 17 jours d'incubation. Témoin. Fixation Elftman. Coloration noir Soudan B.
La répartition des gouttelettes lipidiques est bien systématisée. Les inclusions lipidiques sont plus nombreuses en périphérie des cordons (pôle basal des cellules) qu'au centre (pôle apical des cellules).
CC : cordon cortical. (x 160)

Figure 71 : Poussin 3 jours. 3 injections d'ACTH 10 U.I. par injection. Fixation Elftman coloration noir Soudan B. On note une déplétion presque complète des inclusions lipidiques.
CC : cordon cortical ; CM : cellules médullaires. (x 160)



c) - Aux 14ème et 15ème jours d'incubation, le traitement provoque une dispersion et une disparition des inclusions lipidiques. Les cellules corticales ne renferment plus que de très fines gouttelettes. On n'observe plus la polarité rencontrée habituellement à ce stade dans les cordons centraux chez les embryons témoins.

Au niveau des mitochondries la structure interne des crêtes et tubules est très complexe et semblable à celle observée plus tardivement chez les témoins (18ème jour), des faisceaux de crêtes parallèles sont observés en périphérie de quelques mitochondries de forme arrondie. La matrice mitochondriale renferme de nombreux petits granules denses aux électrons.

Les tubules de réticulum endoplasmique lisse sont très nombreux et occupent tout le cytoplasme.

L'appareil de Golgi est plus développé que chez les témoins et comprend notamment de très nombreuses petites vésicules.

d) - Dans les derniers stades de l'incubation et chez les Poussins, les modifications des organites déjà rencontrées au cours des stades précédents, après traitement par l'ACTH sont toujours observées dans les cordons périphériques et centraux. Toutes les cellules corticales sont hypertrophiées et renferment un gros noyau arrondi, régulier, sans indentations. Les inclusions lipidiques ont disparu et seules subsistent quelques petites gouttelettes disséminées dans le cytoplasme.

Le développement des tubules du réticulum endoplasmique lisse est toujours très important. Les mitochondries ont des crêtes tubulaires dilatées (Planche XVII Figures 64 et 65). L'appareil de Golgi est très développé, on observe dans son voisinage non seulement de nombreuses petites vésicules mais aussi des corps denses à structure hétérogène, qui semblent parfois constitués de matériel lipidique.

D) - DISCUSSION

1°) - L'ACTH agit au niveau de la corticosurrénale embryonnaire en stimulant les cellules. Cette stimulation est accompagnée d'un certain nombre de modifications histochimiques différentes selon l'âge de l'embryon qui est soumis au traitement par l'ACTH.

Nous examinerons donc successivement les résultats obtenus chez des

embryons de 8-9 jours, de 10-12 jours et de 13 jours à la fin de l'incubation.

a) - Chez les embryons de 8 et 9 jours qui ont reçu des injections d'ACTH à partir du 7ème jour d'incubation, il y a une très légère augmentation de la quantité des lipides, du cholestérol et de l'activité enzymatique $\Delta 5 - 3 \beta$ hydroxystéroïdodéshydrogénasique. Donc dans les très jeunes stades l'ACTH semble accélérer la différenciation des cellules corticales.

C'est également le résultat auquel étaient parvenus MOOG et FORD (1957) CASTANE DECOUD, PEDERNERA et NARBAITZ (1964) qui avaient trouvé qu'en injectant de l'ACTH à des embryons de Poulet à partir de la 48ème heure d'incubation, la soudanophilie apparaissait au 5ème jour et la biréfringence au 6ème jour, alors que chez les embryons témoins, ces réactions ne sont positives que 48 heures plus tard.

PEDERNERA (1968) montre que l'accumulation des lipides dans des surrénales embryonnaires de 6 jours en culture, dépend de la présence d'ACTH dans le milieu. Cultivées pendant 6 jours, ces glandes embryonnaires n'accumulent des lipides et du cholestérol que si l'on ajoute de l'ACTH au milieu.

b) - Chez les embryons expérimentaux de 10 à 12 jours qui ont été traités par l'ACTH de 9 jours à 11 jours, on observe peu de différences entre les réactions histochimiques des cellules corticales et celles des embryons normaux. Chez quelques embryons seulement, les réactions de mise en évidence des lipides sont plus intenses, le nombre de cristaux de cholestérol-digtonine plus grand, mais nous n'avons pas observé de modifications dans la réaction de mise en évidence de l'acide ascorbique.

c) - C'est à partir du 13ème jour d'incubation que la glande surrénale répond au traitement par l'ACTH, par une déplétion de ses lipides, de son cholestérol, et de l'acide ascorbique et par une légère augmentation de l'activité $\Delta 5 - 3 \beta$ hydroxystéroïdodéshydrogénasique.

La déplétion lipidique observée traduit donc l'augmentation de la production des corticostéroïdes.

Plusieurs auteurs, ont analysé les corticostéroïdes libérés chez les Oiseaux après action de l'ACTH (NAGRA et Coll. 1960, 1963, DE ROOS 1961,

RESKO et Coll. 1964, HALL et KORITZ 1966). Le principal corticostéroïde libéré est la corticostérone : [DE ROOS (1961), chez différentes espèces d'Oiseaux : Poulet, Mouette, Pigeon, Canard.]

Nos résultats prouvent donc que les cellules corticales ont acquis leur maturité fonctionnelle aux 12^{ème}-13^{ème} jours, mais les cellules corticales très jeunes (7, 8 et 9 jours) ne sont pas insensibles à l'action de l'ACTH puisque leur différenciation est accélérée en sa présence.

Les travaux de FUGO (1940), WOLFF et STOLL (1937) avaient conclu à l'indépendance des glandes surrénales de l'embryon de Poulet à l'égard de l'hypophyse jusqu'au 12^{ème} jour d'incubation. Conclusion qui a d'ailleurs été confirmée par CASE (1952), MAZINA (1963). Ces auteurs ont précisé que le stimulus adrénotrophique est indispensable à la glande surrénale à partir du 12^{ème} jour. ADJOVI (1970) réalisa des hypophysectomies d'embryons de Poulet par décapitation à des stades tardifs et obtint une inhibition de la croissance des cordons corticaux à 10-11 jours, une diminution du cholestérol libre à 12-13 jours. L'auteur conclut que chez l'embryon normal de 10-11 jours, une hormone (ACTH ou autre hormone d'origine hypophysaire) stimule les mitoses des cellules corticales et que l'action spécifique de l'ACTH sur la stéroïdogénèse s'exerce à 12-13 jours.

2°) - La stimulation des cellules corticales sous l'action de l'ACTH se traduit également par des modifications morphologiques ultrastructurales au niveau du noyau, des nucléoles, des ribosomes, des inclusions lipidiques, des mitochondries, du réticulum endoplasmique lisse et de l'appareil de Golgi.

a) - L'augmentation de la taille du noyau et du nucléole a été observée à tous les stades du développement.

Deux auteurs seulement ont signalé ce changement après traitement par l'ACTH : KJAERHEIM (1968) dans les cellules corticales de la Poule, KAHRI (1966) dans les cellules de la corticosurrénale de Rat en culture.

b) - Les ribosomes libres sont plus nombreux après action de l'ACTH. Cette augmentation est observée à tous les stades chez les embryons expérimentaux, elle peut traduire l'augmentation de la synthèse des protéines

et de l'ARN du cortex surrénal (BRANSOME 1963, FARESE 1965) puisque les ribosomes contiennent une grande proportion de l'ARN nécessaire à la synthèse protéique. (SIEKEWITZ et PALADE 1958)

KJAERHEIM (1968) a noté l'augmentation de ribosomes surtout sous forme de rosettes et de polyribosomes chez la Poule après traitement par l'ACTH. JOHANNISSON (1968) observe également une augmentation du nombre des ribosomes libres localisés dans le voisinage du noyau et à la périphérie du cytoplasme, chez des foetus humains après injection d'ACTH intraamniotique.

c) - La dispersion et la déplétion des inclusions lipidiques
à partir du 13ème jour est le fait le plus caractéristique du traitement par l'ACTH.

Les inclusions lipidiques contiennent les précurseurs des hormones stéroïdes, cette déplétion résulte de l'augmentation de l'activité excrétrice des cellules corticales. Cette déplétion s'est traduite chez les embryons par une diminution de la taille des inclusions et par la disparition de la polarité : les grosses inclusions lipidiques situées au pôle basal de la cellule sont remplacées par de très fines gouttelettes dispersées dans le cytoplasme. A partir du 15ème jour et dans les derniers stades de l'incubation, la déplétion se traduit par la disparition des nombreuses gouttelettes à coque osmiophile et à centre clair.

Dans ce cas de stimulation où les cellules libèrent leurs stéroïdes, nous avons donc observé une diminution de la taille des inclusions lipidiques, la dispersion puis la disparition de ces gouttelettes.

Un seul auteur (RHODIN 1970) a observé chez le Rat après traitement par l'ACTH, des gouttelettes lipidiques atteignant la surface cellulaire pour être libérées dans l'espace intercellulaire.

Selon LEVER (1955) les stéroïdes élaborés par les mitochondries diffuseraient dans le cytoplasme et la membrane cellulaire et seraient libérés dans l'espace subendothélial.

Nous devons souligner que les inclusions lipidiques restantes sont en étroit rapport avec le réticulum endoplasmique lisse qui est très développé après expérimentation ACTH, et avec les mitochondries.

On peut donc penser, à l'appui des données biochimiques que l'on possède sur les localisations enzymatiques au niveau du réticulum endoplasmique lisse (coenzyme A, $\Delta 5 - 3 \beta$ hydroxystéroïdodéshydrogénase, 21 hydroxylase)

des mitochondries (11 β hydroxylase, 18 hydroxylase) que de très nombreux échanges s'effectuent entre les gouttelettes lipidiques, le réticulum endoplasmique et les mitochondries, ces images pourraient donc être en rapport avec l'élaboration des stéroïdes.

SABATINI et DE ROBERTIS (1961) pensent que des vésicules mitochondriales quittent les mitochondries, apparaissent dans le cytoplasme et qu'elles auraient un rôle dans l'élaboration des stéroïdes. De même SCHWARZ, MERKER et SUCHOWSKY (1962), NISHIKAWA, MURONE et SATO (1963) pensent que des précurseurs des stéroïdes sont isolés dans des petites vésicules d'origine mitochondriale.

d) - Nous avons vu en étudiant les caractères ultrastructuraux des cellules corticales que l'organisation interne de la mitochondrie est en relation avec la différenciation de cet organe :

Chez les embryons normaux, au cours des premiers stades du développement, les crêtes mitochondriales sont parallèles puis la densité de la matrice s'accroît aux 14^e-15^e jours, c'est également à ce stade que l'on commence à observer des tubules enchevêtrés dans les mitochondries des cordons centraux.

Chez les embryons ayant reçu des injections d'ACTH la différenciation est accélérée : la densité de la matrice s'accroît au 11^e jour. (Planche XVII. Figure 62) Au 15^e jour, la plupart des mitochondries des cordons centraux ont une structure comparable à celle des mitochondries des embryons témoins du 18^e jour d'incubation.

Au cours de cette stimulation expérimentale qui a pour effet d'accroître la stéroïdogénèse, les systèmes 18 et 11 β hydroxylases sont activés ; ces enzymes sont situées dans la fraction mitochondriale, il n'est donc pas surprenant d'obtenir des modifications à l'échelon de cet organe.

Au cours d'études expérimentales, au moyen de l'ACTH, plusieurs auteurs ont noté des modifications mitochondriales :

- KJAERHEIM (1968) observe chez la Poule une densification des mitochondries après traitement par l'ACTH.

- KAHRI (1966) observe dans les cellules de la corticosurrénale de Rat en culture, des modifications mitochondriales quand on ajoute de l'ACTH au milieu : chez le Rat témoin, dans la zone glomérulée la structure interne

mitochondriale est tubulaire, alors qu'elle est tubulovésiculaire ou vésiculaire dans la zone fasciculée et dans la zone réticulée. En culture, les mitochondries des cellules corticales ont la structure typique des cellules de la glomérulée mais l'addition d'ACTH au milieu, induit la transformation de leurs tubules en vésicules typiques des zones fasciculée et réticulée.

- IDELMAN (1966) au cours d'une étude expérimentale sur la corticosurrénale du Rat, note également après action de l'ACTH, une densification de la matrice mitochondriale et une transformation des tubules mitochondriaux en vésicules.

- MILLER et RIDDLE (1942) ont décrit chez le Pigeon après injection d'ACTH une augmentation du nombre des mitochondries.

- LEVER (1956) a observé chez le Rat, après action de l'ACTH, des mitochondries ouvertes et des mitochondries dont les membranes deviennent " plurilamellaires."

- SABATINI, DE ROBERTIS et BLEICHMAR (1962) ont émis l'hypothèse que l'ACTH induit la formation dans les mitochondries de petites vésicules qui sont ensuite déversées dans le cytoplasme.

- KJAERHEIM (1968) après traitement par l'ACTH chez la Poule, observe à la surface des mitochondries des vacuoles ou des bourgeons qui restent recouverts par la membrane externe mitochondriale et ne communiquent pas avec des vacuoles extérieures ou du réticulum endoplasmique. Il pense que ces bourgeons résultent d'altérations physiologiques et non des artéfacts puisqu'il ne les observe jamais chez les témoins et qu'il utilise dans les deux cas des fixations par perfusion.

e) - Chez les embryons de 14 jours d'incubation, 3 ou 4 injections d'ACTH provoquent le développement du réticulum endoplasmique lisse sous forme de tubules et de vésicules, il est très souvent accolé aux mitochondries et il entoure les inclusions lipidiques d'une ou de plusieurs couches de tubules.

Son hypertrophie après traitement par l'ACTH a également été remarquée chez le Rat in vivo (SCHWARZ, MERKER et SUCHOWSKY 1962) in vitro (KAHRI 1966) et chez la Poule (KJAERHEIM 1968).

JOHANNISSON (1968) a observé une augmentation de la dilatation des tubules et leur transformation en petites vésicules après injection intra-amniotique d'ACTH à des foetus humains.

ASHWORTH et Coll. (1959) rapportent également la présence de réticulum endoplasmique lisse sous forme de vésicules dans le cortex surrénal de Rat, stimulé par l'ACTH.

KAHRI (1968) fait la même observation dans des surrénales foetales de Rat cultivées en présence d'ACTH.

Le réticulum endoplasmique lisse est un organite impliqué dans la stéroïdogénèse puisqu'il renferme plusieurs systèmes enzymatiques nécessaires à cette synthèse : le coenzyme A nécessaire à la formation du cholestérol à partir d'acétate, la $\Delta 5 - 3 \beta$ HSD qui intervient dans la transformation de la prégnénolone en déoxycorticostérone. Son hypertrophie après action de l'ACTH dans les cellules corticales aux 14ème-15ème jours est donc une preuve de l'activité de synthèse stéroïdienne de ces cellules.

D'autre part, le développement de cet organite qui résulte de l'expérimentation ACTH, nous fournit une indication sur le moment où les cellules corticales semblent aptes à commencer l'élaboration des stéroïdes : au 10ème jour, les cellules corticales embryonnaires sont sensibles à l'action de l'ACTH. Or au cours de l'histogénèse, le réticulum endoplasmique lisse se développe à partir du 10ème jour, et devient important au 12ème jour. Nous pouvons en conclure que l'hypophyse commence probablement à agir au 10ème jour et qu'au 12ème jour, l'axe hypophyso-surrénalien est établi et fonctionnel.

f) - L'appareil de Golgi augmente de taille après action de l'ACTH à partir du 14ème jour d'incubation et produit de très nombreuses vésicules.

Des corps denses sont observés dans son voisinage au cours des derniers stades de l'incubation (17ème-18ème jours).

Si le rôle de l'appareil de Golgi dans la synthèse des protéines est bien connu, par contre son rôle dans la synthèse stéroïdienne est très discuté. Dans notre expérimentation son augmentation de taille après injection d'ACTH peut résulter de l'action de l'ACTH, de l'augmentation de la synthèse des protéines ou de la production des stéroïdes, mais nous n'avons pas d'arguments à apporter à cette dernière hypothèse.

En conclusion, l'expérimentation entreprise à l'aide de l'ACTH chez les embryons a fourni plusieurs résultats :

- La déplétion lipidique, en cholestérol et en acide ascorbique qui se produit à partir du 13ème jour a lieu dans tous les cordons corticaux périphériques ou centraux, chez l'embryon de Poulet.

Il n'y a donc pas de zonation fonctionnelle comme celle que l'on trouve chez les Mammifères. La glande surrénale entière semble donc être sous la dépendance de l'hypophyse.

- A partir du 13ème jour de la vie embryonnaire, les cellules corticales répondent à la stimulation provoquée par l'ACTH, par des variations de leurs caractères morphologiques ultrastructuraux et de leurs caractères histochimiques. C'est donc à cette date qu'elles ont acquis leur maturité fonctionnelle.

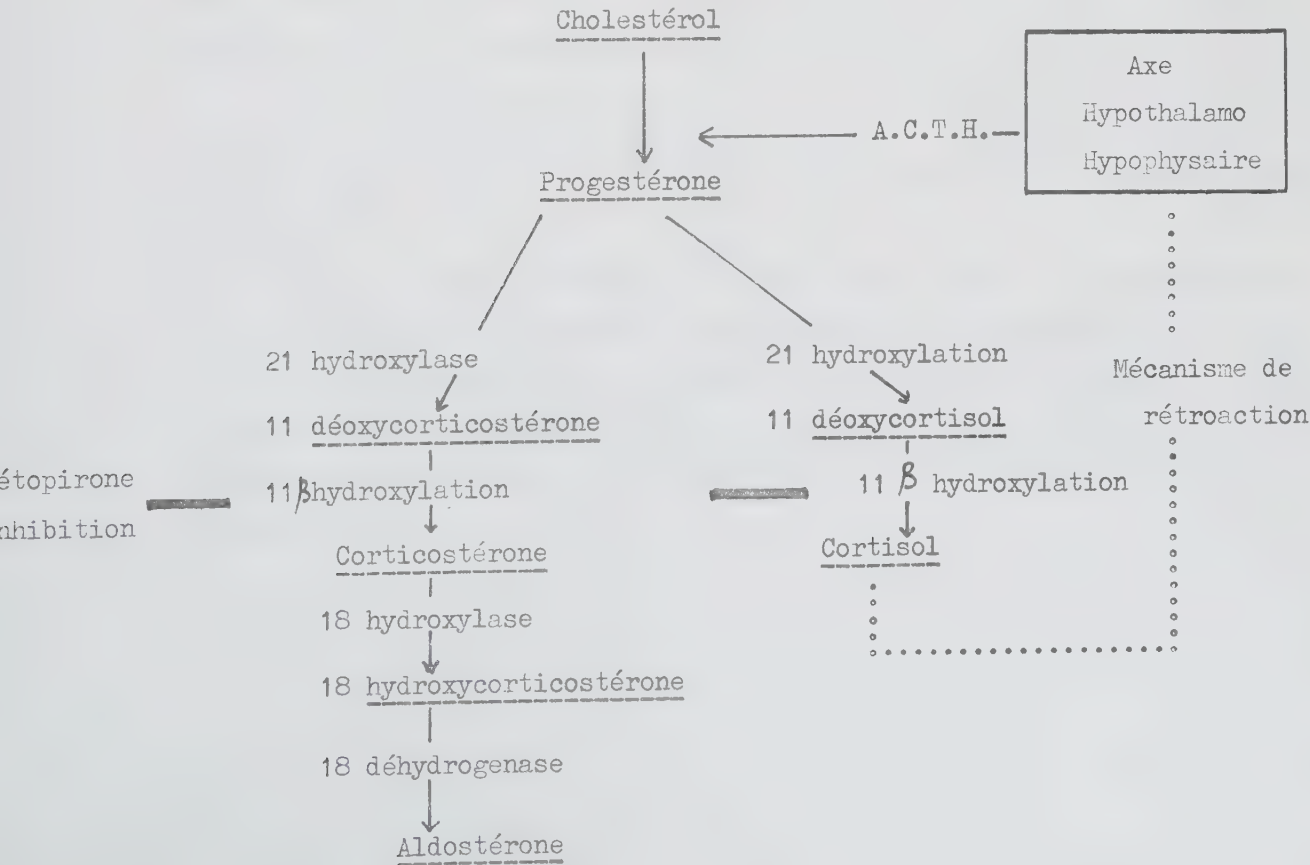
- Les cellules corticales embryonnaires de 7, 8 et 9 jours sont également réceptives à l'action de l'ACTH puisque leur différenciation est accélérée en sa présence.

II - ACTION DE LA METOPIRONE

A) - INTRODUCTION

Après avoir modifié le fonctionnement du système hypophyso-surrénalien par des injections d'ACTH, nous avons poursuivi notre expérimentation portant sur les cellules corticales en inhibant une étape de la biosynthèse des stéroïdes par la Métopirone.

La Métopirone (Su 4885 Ciba) inhibe relativement sélectivement la 11β hydroxylase [LIDDLE et Coll. (1958), JENKINS (1958), JENKINS et Coll. (1959), GAVRILOVE (1967)]. La 11β hydroxylase est l'enzyme nécessaire à la conversion de la 11 déoxycorticostérone en corticostérone et à la conversion du 11 déoxycortisol en cortisol. Les synthèses du cortisol et de la corticostérone sont donc bloquées. Chez les Oiseaux et chez le Rat, c'est la corticostérone qui prédomine et dans cette dernière espèce, c'est elle qui influe sur la sécrétion d'ACTH. Donc en inhibant une étape de la biosynthèse de la corticostérone et du cortisol, la sécrétion d'ACTH augmente (DEXTER et Coll. 1967), ce qui entraîne une augmentation de la synthèse des précurseurs de la corticostérone et du cortisol (GRANT 1960).



Cette hypersécrétion d'ACTH provoquée indirectement par la Métopirone est utilisée pour tester l'activité hypophysaire chez l'Homme (LIDDLE et Coll. 1958). Elle a également été utilisée pour identifier les cellules corticotropes chez des Mammifères [BUGNON (1961), HERLANT et KLASTERKY (1963), GIROD et Coll. (1964)], chez le Canard (TIXIER VIDAL et ASSENMACHER 1963), chez des Téléostéens (OLIVEREAU et BALL 1963).

La chute des corticostéroïdes après traitement par la Métopirone a été démontrée chez le Poulet par NAGRA, SAUERS et WITTMAYER (1965) qui trouvent un abaissement du taux de corticostérone dans le sang veineux surrénalien de plus de 50 % par rapport aux témoins.

Les études histologiques au niveau de la glande surrénale après action de la Métopirone ont été effectuées chez divers Vertébrés : chez la Grenouille (GAUDRAY 1968, VAN KEMENADE 1968), chez la Salamandre (BERCHTOLD 1966), chez le Canard (TIXIER VIDAL et ASSENMACHER 1963), chez l'embryon de Poulet (STOLL FAUCOUNAU et MARAUD 1964), chez le Rat [BUGNON et LENYS (1963), MIETKIEWSKI et MALENDOWICZ (1965) SZCZEPSKI et Coll. (1967)], chez la Souris (BUGNON et LENYS 1964), chez le Cobaye (HERMANN et Coll. 1967). Chez tous ces Vertébrés, le tissu cortical est stimulé, chez les Mammifères c'est la zone fasciculée qui est activée : BUGNON (1962). VOTH et Coll. (1964) ont souligné que la Métopirone est aussi capable d'activer la zone glomérulée si la sécrétion des 11 déoxycorticostéroïdes est insuffisante pour maintenir une balance électrolytique normale.

Les observations ultrastructurales de la corticosurrénale après traitement par la Métopirone sont beaucoup plus rares : SCHWARZ et SUCHOWSKY (1963), IDELMAN (1966), MAGALHAES et MAGALHAES (1967), LUSE (1967), SHARAWY et PENNEY (1969, 1970) .

Chez la Poule, KJAERHEIM (1968) a étudié l'action de la Métopirone sur l'ultrastructure des cellules interrénales. Les changements ultrastructuraux les plus importants sont observés au niveau des mitochondries : LUSE (1967), SCHWARZ et SUCHOWSKY (1963) ont mentionné des altérations des membranes externes des mitochondries, IDELMAN (1966) a observé des mitochondries dégénérantes.

B) - MATERIEL ET TECHNIQUES

Chez les embryons, la Métopirone Su 4885 Ciba est déposée sur la membrane chorioallantoïdienne, à la concentration de 2,5mg par jour pendant 3 ou 4 jours. La dilution de la solution est faite avec du sérum physiologique.

Les Poussins ont reçu quotidiennement 25mg de Métopirone par injection sous-cutanée . Certains ont été traités pendant 13 jours.

Les prélèvements effectués le jour de la dernière injection ont été fixés en vue de :

- l'étude histologique classique
- l'étude en microscopie électronique
- l'étude histochimique : - coupes au cryostat, recherche de lipides, de cholestérol, de la $\Delta^5 - 3 \beta$ HSD.
- coupes paraffine après insolubilisation des lipides (fixation d'ELFTMAN)

Les différentes techniques ont été exposées dans le chapitre MATERIEL ET TECHNIQUES.

C) - RESULTATS

Les observations ont été faites chez des embryons de 9 jours à l'éclosion et chez des Poussins de 1 jour à 15 jours. Certains Poussins ont présenté un état de choc dès la première injection.

1°) - MICROSCOPIE OPTIQUE

L'examen des coupes en microscopie optique révèle une hypertrophie due à l'agrandissement des cordons corticaux. Les lumières vasculaires paraissent alors réduites.

L'hypertrophie est générale, les cordons corticaux périphériques et centraux sont agrandis. (Planche XX Figure 74) Cette hypertrophie cellulaire est accompagnée d'une augmentation de la taille des noyaux et des nucléoles.

Chez les embryons de 9 jours à 14 jours, nous n'avons pas observé de

changements dans l'intensité des réactions de mise en évidence des lipides. (Oil Red O, Fettrot 7 B, ELFTMAN-noir Soudan B, digitonine-cholestérol)

Ce n'est qu'à partir du 15ème jour d'incubation que 3 injections de Métopirone provoquent une déplétion lipidique, (Planche XX Figures 76 et 77) et une diminution du nombre des cristaux de cholestérol.

Au cours de cette déplétion, les inclusions lipidiques situées au pôle basal des cellules, se dispersent en une multitude de très fines gouttelettes. (Planche XX Figure 77)

Nous n'avons observé aucun changement dans l'activité enzymatique

$\Delta 5 - 3 \beta$ hydroxystéroïdodéshydrogénasique chez les embryons. Il n'y a que chez les Poussins ayant été sous traitement par la Métopirone pendant 13 jours que nous avons observé une augmentation de cette activité.

2°) - MODIFICATIONS ULTRASTRUCTURALES

Les premières modifications sont observées chez des embryons expérimentaux de 10 jours. Elles commencent par une densification de la matrice mitochondriale et par une augmentation du nombre des tubules du réticulum endoplasmique lisse.

Chez les embryons expérimentaux à partir du 12ème jour d'incubation, le liposome est impliqué dans les modifications ultrastructurales. Les gouttelettes lipidiques semblent plus nombreuses et certaines ont tendance à confluer entre elles.

Au 14ème jour, les mitochondries très denses renferment des granules en plus grand nombre que chez les témoins. Le réticulum endoplasmique est toujours assez développé. Ces signes d'activité sont complétés par une augmentation de la taille de l'appareil de Golgi.

A partir du 18ème jour, les figures de mitoses sont plus souvent rencontrées que chez les embryons témoins. L'hypertrophie cellulaire est accompagnée par une augmentation de la taille des noyaux et des nucléoles. Les noyaux sont plus arrondis et plus réguliers.

Les mitochondries sont de taille et de forme variables. Tandis que chez les témoins, les mitochondries des cordons centraux sont le plus souvent de forme arrondie en fin d'incubation, et dans les cordons périphériques de

PLANCHE XIX

PLANCHE XIX

Figure 72 : Embryon 18 jours d'incubation. 2 injections de Métopirone : 2,5mg par injection. Cellules corticales montrant de volumineuses inclusions lipidiques.

Li : liposome ; M : mitochondrie ; N : noyau. (x 4 000)

Figure 73 : Embryon 18 jours. 3 injections de Métopirone : 2,5mg par injection. Cellules corticales hypertrophiées ne renfermant que de rares gouttelettes lipidiques.

Les mitochondries de forme irrégulière sont très denses.

L'appareil de Golgi est bien développé.

G : appareil de Golgi ; Li : liposome ; M : mitochondrie ; N : noyau ; V : vacuole. (x 8 000)

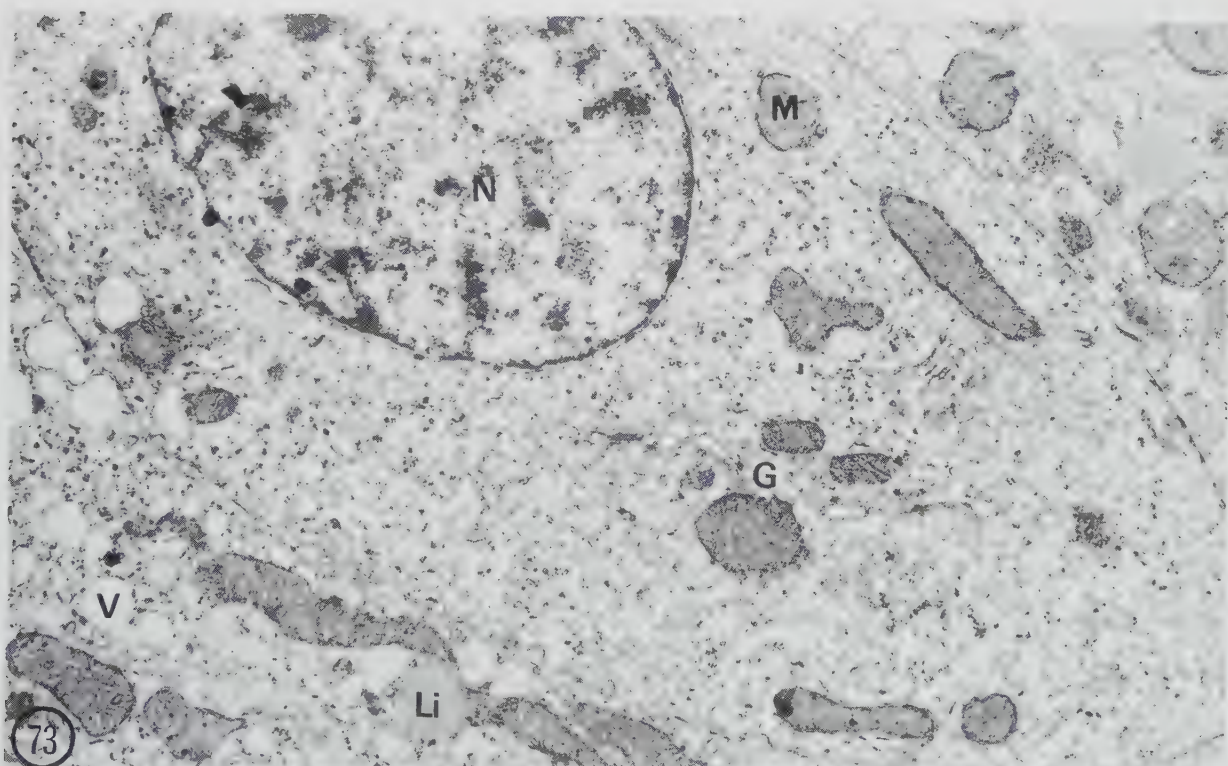
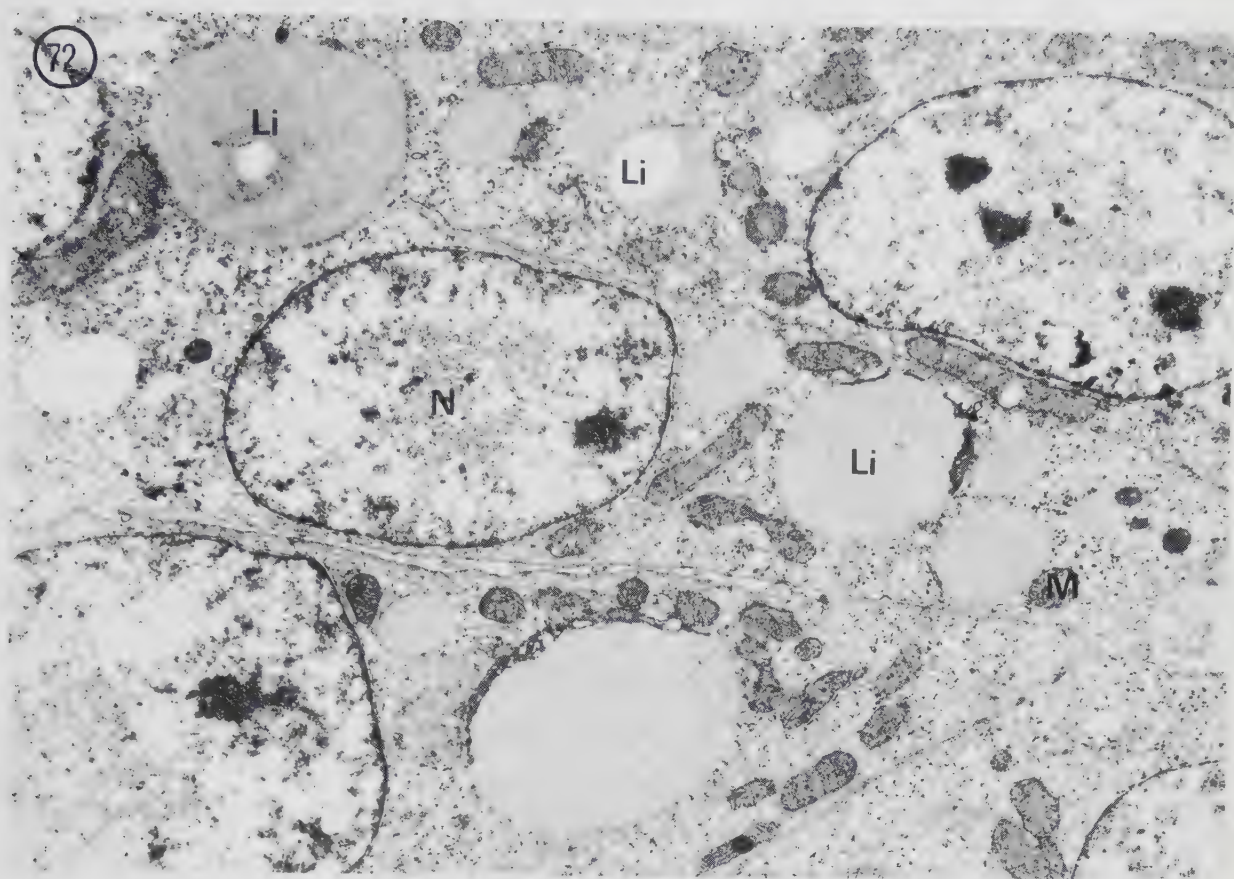


PLANCHE XX

PLANCHE XX

Figure 74 : Poussin 8 jours. 3 injections de Métopirone : 25 mg. par injection. Fixation Helly coloration trichrome de Masson. On note l'hypertrophie importante des cordons corticaux.
CC : cordon cortical ; CM : cellules médullaires ; L : lumière de vaisseau. (x 250)

Figure 75 : Poussin 8 jours. Témoin. Fixation Helly coloration trichrome de Masson.
CC : cordon cortical ; CM : cellules médullaires. (x 250)

Figure 76 : Embryon 19 jours d'incubation. 2 injections de Métopirone : 2,5mg. par injection. Coupe au cryostat coloration Oil Red O. On observe une déplétion des enclaves lipidiques.
CC : cordon cortical ; CM : cellules médullaires. (x 63)

Figure 77 : Embryon 19 jours d'incubation. 3 injections de Métopirone : 2,5mg par injection. Les cordons corticaux sont hypertrophiés. La déplétion est très nette. (cf. témoin figure 68) et se manifeste par la disparition des inclusions situées au pôle basal des cellules et la dispersion du matériel lipidique sous forme de très fines gouttelettes.
CC : cordon cortical ; CM : cellules médullaires. (x 160)

74

CM

L

CC

L

75

CC

CM

CC

CM

76

CC

CM

77

forme allongée ou irrégulière, chez les embryons soumis au traitement par la Métopirone, elles restent de forme très variable et très irrégulière dans tous les cordons (Planche XIX Figures 72 et 73). Toujours très denses, elles présentent fréquemment des étirements, des étranglements suggérant une division proche. D'autres mitochondries étirées en leur centre et renflées aux extrémités sont enroulées autour d'inclusions lipidiques ou d'une portion de cytoplasme renfermant ou non des éléments de réticulum endoplasmique lisse.

Lorsque la structure interne est composée de crêtes lamellaires, leur arrangement est moins régulier que chez les témoins. Dans les mitochondries de forme arrondie rencontrées dans les cordons centraux, les tubules sont dilatés, la matrice très dense renferme des granules en nombre plus important que chez les témoins.

Le réticulum endoplasmique lisse et l'appareil de Golgi sont très développés.

Les inclusions lipidiques chez ces embryons en fin d'incubation sont moins nombreuses que chez les témoins, chez les embryons ayant reçu 1 ou 2 injections, les inclusions qui persistent dans le cytoplasme sont quelquefois agrandies, volumineuses, ce sont alors des coques à périphérie dense très épaisse (Planche XIX Figure 72). Des inclusions de petite taille confluent pour donner des flaques lipidiques.

Chez les embryons ayant reçu 3 ou 4 injections, les cellules corticales ne renferment plus que de très petites gouttelettes denses (Planche XIX Figure 73).

On observe fréquemment des tubules de réticulum endoplasmique lisse entourant les mitochondries et les liposomes.

Chez les Poussins expérimentaux, on retrouve les modifications déjà décrites : développement du réticulum endoplasmique lisse, augmentation de la taille du complexe golgien, augmentation de la taille du noyau et du nucléole, augmentation de la densité mitochondriale, irrégularité de la forme des mitochondries, diminution du nombre des inclusions lipidiques. Chez les Poussins soumis à un long traitement Métopirone (13 jours), le nombre de corps denses toujours situés à la partie apicale de la cellule a augmenté.

D) - DISCUSSION

L'administration de la Métopirone a pour résultat une augmentation

de l'activité sécrétoire des cellules corticales : le principal effet de la Métopirone est l'inhibition de la 11β hydroxylation des stéroïdes. La chute du taux des 11β hydroxystéroïdes qui normalement régule la sécrétion de l'ACTH, provoque une sécrétion accrue de l'ACTH hypophysaire et par conséquent une hypertrophie des cellules corticales et une augmentation de la sécrétion des 11 déoxycorticostéroïdes.

Chez l'embryon de Poulet la Métopirone affecte l'axe hypophyso-surrénalien comme chez les Mammifères :

1°) - Chez l'embryon de Poulet et le Poussin, l'hypertrophie de la surrénale observée à partir du 14ème jour est due à l'augmentation de la taille de tous les cordons corticaux, tandis que chez les Mammifères l'augmentation de la taille des surrénales est due à l'agrandissement des zones fasciculée et réticulée (chez le Rat, PENNEY et AVERILL 1971). Chez l'embryon de Poulet la glande surrénale entière dépend de l'ACTH hypophysaire : conclusion à laquelle nous étions parvenus après expérimentation par l'ACTH.

L'hypertrophie des cordons corticaux avait été observée à partir du 12ème jour chez l'embryon de Poulet (STOLL, FAUCOUNAU et MARAUD 1963). Nous avons également retrouvé ce résultat mais chez quelques embryons de 12 jours seulement, l'hypertrophie n'est retrouvée régulièrement que chez les embryons de 14 jours.

2°) - Sur le plan ultrastructural nous observons un ensemble de modifications reflétant une activité sécrétoire accrue. Ces modifications se situent au niveau du noyau, du nucléole, des mitochondries, du réticulum lisse, du complexe golgien, des gouttelettes lipidiques et des corps denses.

Si certaines modifications des organites sont semblables à celles observées après traitement par l'ACTH : développement du réticulum endoplasmique lisse, de l'appareil de Golgi, densification des mitochondries, il reste cependant quelques caractères propres à l'action de la Métopirone qui diffèrent des changements induits après un traitement par l'ACTH, ce sont :

- l'irrégularité de la forme des mitochondries,
- l'aspect des liposomes : confluence d'inclusions, aspect de coque à périphérie très épaisse.

a) - L'augmentation de la taille du noyau et du nucléole est bien en relation avec l'activité de la cellule. Nous avons d'ailleurs observé ce changement également après traitement par l'ACTH. Après action de la Métopirone il a été observé par KJAERHEIM (1968) chez la Poule, par HANKE et WEBER (1965) chez la Grenouille.

b) - Le premier organite subissant des variations est la mitochondrie. L'augmentation de la densité mitochondriale est le premier signe d'activité cellulaire observée chez les embryons dès le 10ème jour. Ce changement a été signalé par la plupart des auteurs ayant expérimenté la Métopirone, par IDELMAN (1966), MAGALHAES et MAGALHAES (1970) chez le Rat, par KJAERHEIM (1968) chez la Poule. Les variations mitochondriales (hétérogénéité des formes, parmi lesquelles certaines font penser à des figures de division, augmentation de la densité, du nombre des granules intramitochondriaux), reflètent l'état d'activité croissante de la cellule corticale. Elles ne sont pas surprenantes, puisque la Métopirone agit au niveau de la 11β hydroxylation, étape mitochondriale de la stéroïdogénèse.

La grande variation de taille et de forme dans les mitochondries a été retrouvée chez le Rat après traitement par la Métopirone (PENNEY et AVERILL 1971).

c) - Le réticulum endoplasmique lisse, comme les mitochondries est un des principaux organites impliqués dans la biosynthèse des stéroïdes. Son développement a déjà été noté après expérimentation par l'ACTH, ce critère constitue un signe d'activité sécrétoire accrue de la cellule corticale. La synthèse de déoxycorticostérone et du 11 déoxycortisol, provoquée par la sécrétion d'ACTH hypophysaire nécessite la 21 hydroxylase située dans le réticulum endoplasmique lisse. Des variations quantitatives ont également été signalées dans d'autres cellules sécrétant des stéroïdes (cellules lutéiniques de la granulosa de l'ovaire, cellules interstitielles du testicule) suivant leur état d'activité. Les rapports fréquents de contiguité entre réticulum endoplasmique et mitochondries sont déjà signalés 1 heure après injection de la Métopirone chez le Rat (SHARAWY et PENNEY 1969). Au bout de 7 jours de traitement, le réticulum endoplasmique lisse est intimement juxtaposé aux mitochondries et aux gouttelettes lipidiques (SHARAWY et PENNEY 1970). La dilatation des tubules a été observée par KJAERHEIM (1968) chez la Poule. SCHWARZ et SUCHOWSKY (1963) n'observent pas d'hypertrophie du réticulum après action de la Métopirone,

mais ces auteurs ont étudié ses effets 30 minutes seulement après une seule injection.

d) - L'augmentation de la taille de l'appareil de Golgi, semble traduire l'augmentation de l'activité de la cellule. Elle a été observée à partir du 14ème jour. Nous l'avons déjà observée après action de l'ACTH. Nous connaissons mal son rôle dans les cellules élaborant des hormones stéroïdes. Son accroissement n'est peut-être que l'expression d'une stimulation générale de la cellule.

e) - Les gouttelettes lipidiques semblent être plus nombreuses chez l'embryon de 10 jours à 14 jours, mais ces différences ne sont pas significatives puisque nous avons vu qu'à ces stades, les réactions histochimiques sont inchangées. Par contre, chez les embryons de 15 jours à 20 jours d'incubation, et chez le Poussin, le nombre des inclusions lipidiques est diminué. Ce fait est en accord avec les observations de LUSE (1967), MIETKIEWSKI et MALENDOWICZ (1965), KJAERHEIM (1968). Par contre, SHARAWY et PENNEY (1970) ont trouvé chez le Rat soumis pendant 7 jours au traitement par la Métopirone des inclusions lipidiques plus grandes et plus nombreuses que chez les témoins, ce qui correspondait histochimiquement à une augmentation du stockage des lipides intracellulaires.

f) - Les corps denses. Parallèlement à la diminution du nombre d'inclusions lipidiques, on observe une augmentation du nombre de corps denses. Nous ne savons pas de quelle façon ces corps sont impliqués dans la fonction sécrétoire de la cellule, il semble pourtant qu'il y ait une relation entre cet organite et l'activité de la cellule sécrétant des stéroïdes, car inversement on observe que leur nombre diminue quand celui des enclaves lipidiques augmente après inhibition de la cellule (DAHL 1970, tissu interstitiel de l'ovaire).

SMITH et FARQUAR (1966), KJAERHEIM (1968) ont d'ailleurs émis l'hypothèse que les corps denses ou lysosomes constitueraient un mécanisme d'utilisation de l'excès de produits de sécrétion. Cette hypothèse a également été évoquée par FRANCO, GUEDENET et GRIGNON (1971). Il faut rappeler, que ces corps denses renferment une phosphatase acide, or MIETKIEWSKI (1965) a noté un accroissement de l'activité phosphatasique acide dans la surrénale du Rat après Métopirone.

L'augmentation du nombre de mitoses, l'hypertrophie cellulaire, les modifications ultrastructurales qui suivent l'administration de Métopirone reflètent nettement la stimulation des cellules corticales. Cette stimulation est le résultat d'une sécrétion accrue d'ACTH; mais une action directe de la Métopirone sur les cellules corticales ne doit pas être exclue (OLIVEREAU 1965).

3°) - Chez les embryons de 10 jours à 14 jours, le traitement par la Métopirone ne produit aucune variation dans les réactions de mise en évidence des lipides neutres, du cholestérol, de l'acide ascorbique. Par contre, les premières modifications ultrastructurales chez les embryons expérimentaux débutent au 10ème jour par la densification des mitochondries. Etant donné que celles-ci sont le siège de la 11β hydroxylation (étape inhibée par la Métopirone) on peut admettre qu'à cette date les premières étapes de la synthèse stéroïdienne sont donc bien démarrées. Au 10ème jour, chez les embryons expérimentaux le nombre de tubules du réticulum endoplasmique lisse est supérieur à celui des témoins, ce qui permet de penser que ce développement est dû à l'action de l'ACTH d'origine hypophysaire, donc que le mécanisme de rétroaction a fonctionné après blocage de la 11β hydroxylation. L'axe hypophyso-surrénalien est donc établi au 10ème jour de la vie embryonnaire.

ETUDE EXPERIMENTALE
PORTANT SUR LES
CELLULES ADRENALES OU MEDULLAIRES

ACTION DE LA RESERPINE

A) - INTRODUCTION

Afin de modifier le contenu en catécholamines des cellules adrénales ou médullaires, nous avons utilisé l'action de la réserpine, substance connue pour son action déplétive des catécholamines chez les Mammifères.

La réserpine est un alcaloïde extrait des racines d'un arbuste "Rauwolfia serpentina". Ses propriétés thérapeutiques étaient connues depuis longtemps en Inde lorsqu'on a commencé à l'utiliser en psychiatrie pour ses effets neurodépresseurs. Les extraits isolés de cet arbuste possédaient des propriétés hypotensives. En 1952, MUELLER, SCHLITTER et BEIN ont donné le nom de réserpine à cet alcaloïde isolé de "Rauwolfia serpentina". C'est à partir de 1953 que débutèrent les recherches sur ses différentes actions :

- action sur l'appareil génital ♂ et ♀.
- action sur la glande mammaire par l'intermédiaire de l'hypophyse [DESCLIN (1957), TUCHMANN - DUPLESSIS (1958)].
- action sur la cytologie du lobe antérieur de l'hypophyse [TUCHMANN - DUPLESSIS (1960), HERLANT et PASTEELS (1959), PASTEELS (1961), RACADOT (1960), GIROD (1962), ASSENMACHER et TIXIER - VIDAL (1962), BUGNON, LENYS et MOREAU (1964)].
- action sur le contenu en catécholamines de la médullosurrénale (CARLSSON et HILLARP 1956).

Différents auteurs montrèrent qu'elle provoquait une déplétion des catécholamines non seulement dans la médullosurrénale mais aussi dans l'hypothalamus (HOLTZBAUER et VOGT 1956) et dans les ganglions sympathiques (MUSCHOLL et VOGT 1958).

Un grand nombre d'études ont été publiées démontrant une perte prononcée de catécholamines dans la médullosurrénale :

- déplétion sélective de noradrénaline chez le Rat [CAMANNI, LOZANA et MOLINATTI (1958), ERANKO et HOPSU (1958)].
- déplétion d'adrénaline et de noradrénaline [CARLSSON et HILLARP (1956), ERANKO et HOPSU (1958), CALLINGHAM et MANN (1958 a, b)].

Les modifications ultrastructurales de la médullosurrénale après action de la réserpine ont été étudiées par CLEMENTI et ZOCCHÉ (1962), COTTE, MONNERON, MICHEL - BECHET et PICARD (1963), MICHEL - BECHET, COTTE et HAON (1964), YATES (1964), FLETCHER (1964), ELFVIN (1968) .

Si les expérimentations concernant cette drogue abondent chez les Mammifères adultes, à notre connaissance, il n'existe aucune étude ultrastructurale portant sur son action au cours de l'histogenèse des cellules médullaires.

Nous n'avons trouvé qu'une référence bibliographique concernant son action chez l'embryon de Poulet : ADAMS et HIRCHINSON (1959) qui ont montré que la réserpine provoquait un retard général de la croissance chez l'embryon.

Nous avons entrepris cette étude d'une part pour reconnaître les étapes de la déplétion des cellules en catécholamines et d'autre part pour rechercher à quelle époque de la vie embryonnaire ces cellules deviennent sensibles à l'action de la réserpine.

B) - MATERIEL ET TECHNIQUES

Nous avons effectué cette expérimentation sur des embryons de 10 jours à 20 jours d'incubation, sur des Poussins de 1 jour à 15 jours et sur des Poulets âgés de 3 mois.

Nous leur avons injecté du Serpasil (CIBA) à la dose de :

- 0,25mg/100g de poids, par injection sous-cutanée, chez les Poulets et les Poussins de 15 jours.
- 0,15mg/100g de poids, par injection, chez les Poussins de 7 jours.
- 0,10mg/100g de poids, chez les embryons de 10 jours à 20 jours et les Poussins de 1 jour.

Chez les embryons, le volume de Serpasil correspondant à cette dose a été déposé en une seule fois sur la membrane chorioallantoïdienne.

Chez les Poussins et les Poulets, le Serpasil est injecté 1, 2 ou 3 fois à 24 heures d'intervalle.

Dès la première injection, certains Poussins sont dans un état léthargique ou somnolent. La deuxième injection est généralement mal supportée.

Les prélèvements ont eu lieu de la 2ème heure après l'injection jusqu'au 5ème jour après la dernière injection.

Les glandes surrénales des Poussins et des Poulets ont été fixées en

vue de l'observation en microscopie optique :

- pour l'étude cytologique classique par la fixation de Helly,
- pour l'étude histochimique des réactions d'oxydation des catécholamines par le mélange bichromate-chromate de potassium (HILLARP et HÖKFELT), par l'iodate de potassium (HILLARP et HÖKFELT), par le nitrate d'argent ammoniacal (TRAMEZZANI, CHIOCCHIO et WASSERMANN).

- en vue de l'observation en microscopie électronique :

- par la double fixation glutaraldéhyde-acide osmique.

Les glandes surrénales de chaque embryon ou Poussin expérimental étaient découpées et fixées dans les fixateurs appropriés de sorte qu'à chaque prélèvement observé en microscopie électronique, correspondait des prélèvements homologues fixés selon les différentes techniques histochimiques.

Etant donné que les réactions phéochromes au bichromate-chromate et à l'iodate de potassium étaient extrêmement faibles chez les embryons normaux, les glandes surrénales des embryons expérimentaux ont été fixées selon la technique de TRAMEZZANI appliquée à la microscopie électronique, et par la double fixation glutaraldéhyde-acide osmique pour l'étude ultrastructurale.

C) - RESULTATS

1°) - MICROSCOPIE OPTIQUE

a) - Chez les Poussins et les Poulets

Pendant les 4 premières heures qui suivent l'injection de Serpasil, on ne constate aucune modification dans les réactions d'oxydation des catécholamines. L'aspect cytologique est normal, quelques vaisseaux semblent dilatés.

C'est à partir de 5 heures après l'injection qu'on note un début d'affaiblissement de toutes les réactions histochimiques (Planche XXIII Figure 86). La vasodilatation est importante.

12 heures après une injection, la réaction phéochrome varie d'une faible coloration jaune à la disparition complète de la réaction dans d'autres glandes. Cette diminution d'intensité des réactions, se poursuit et en 24 heures, les réactions phéochromes au bichromate-chromate, à l'iodate, la réaction au nitrate d'argent ammoniacal sont presque totalement négatives.

La déplétion des catécholamines est maximale à ce moment. Quelques cellules éparses ont cependant encore une réaction positive à la technique de TRAMEZZANI.

Les altérations cytologiques sont importantes, elles n'affectent que les cellules médullaires dont les flots sont désorganisés ; de nombreuses cellules sont vacuolisées. Certaines semblent même être lysées. La vasodilatation est très importante, les plus petits vaisseaux renferment des hématies.

Chez les Poussins et les Poulets qui ont reçu 2 et 3 injections de Serpasil, les réactions histochimiques sont négatives.

Les altérations cytologiques au niveau des cellules médullaires sont étendues. La vacuolisation est toujours observée. Par contre, les cordons corticaux semblent hypertrophiés. Ces aspects persistent pendant 3 jours, puis au 5ème jour, les cellules médullaires reprennent un aspect normal, de rares cellules sont encore vacuolisées. La réaction phéochrome redevient légèrement positive de couleur jaune pâle alors que les cellules médullaires des Poussins témoins sont de teinte jaune-brun.

b) - Chez les embryons de 14 jours à 20 jours

Les embryons n'ont reçu qu'une seule injection de 0,10mg/100g de poids.

Les résultats sont étroitement comparables à ceux obtenus chez les Poussins. L'intensité de la réaction au nitrate d'argent ammoniacal diminue de façon très nette 4 à 5 heures après l'injection et en 24 heures est presque entièrement négative (Planche XXIII Figure 88).

En microscopie optique, l'examen cytologique montre une vasodilatation importante (Planche XXIII Figure 89). Par contre, la vacuolisation cellulaire semble moins importante que chez les Poussins.

c) - Chez les embryons de 10 jours à 14 jours

L'intensité de la réaction de la mise en évidence de noradrénaline par la technique de TRAMEZZANI est variable selon les embryons. Chez certains d'entre eux, l'intensité générale de la réaction est affaiblie, la majorité des cellules médullaires est recouverte d'un précipité d'argent peu abondant. Chez d'autres embryons, l'intensité de la réaction est comparable à celle observée chez les embryons témoins.

2°) - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

a) - Chez les Poussins

Dès la 4ème heure après la première injection, on observe une perte de la densité des grains osmiophiles, dans les deux "types" de cellules médullaires. Le centre dense des grains riches en adrénaline tend à disparaître.

12 heures après une injection, lorsque les réactions phéochromes sont affaiblies mais encore positives, les altérations ultrastructurales montrent une réduction progressive de la densité des grains osmiophiles. Le halo clair situé entre le contenu du grain et de la membrane est souvent agrandi. L'arrangement des microgranules des "grains d'adrénaline" est beaucoup moins compact que chez les embryons témoins. Certains grains semblent même être désagrégés. D'autres sont vidés de leur contenu dense et souvent il ne subsiste qu'un matériel floconneux.

De nombreuses vacuoles sont apparues dans le cytoplasme de toutes les cellules médullaires (Planche XXI Figures 79 et 80). Certaines vacuoles semblent provenir de grains vidés de leur contenu, car on observe tous les aspects intermédiaires entre le grain de structure sensiblement normale et la vacuole qui renferme un léger matériel diffus. D'autres vacuoles pourraient provenir du réticulum endoplasmique lisse dilaté.

La vasodilatation générale observée en microscopie optique, est retrouvée à l'échelle ultrastructurale où les plus petits espaces vasculaires ont augmenté de taille.

4 heures après 2 injections, certaines cellules médullaires sont totalement dégranulées (Planche XXII Figure 81). D'autres renferment encore quelques grains denses. Les altérations cellulaires sont accentuées. Les cellules les plus altérées montrent un cytoplasme empli de vacuoles et de vésicules, elles contiennent très peu de granules opaques. Pourtant certaines cellules avant même d'être totalement épuisées, montrent des signes d'activité de synthèse : l'appareil de Golgi est bien développé et entouré de nombreuses petites vésicules dont certaines renferment un matériel légèrement dense. Les tubules ergastoplasmiques entourent fréquemment les mitochondries.

3 jours après la dernière injection, 2 catégories morphologiques de grains sont apparues dans le cytoplasme de toutes les cellules médullaires.

PLANCHE XXI

PLANCHE XXI

Figure 78 : Embryon 20 jours d'incubation. 1 seule injection de Serpasil (0,10mg de réserpine). Cellules médullaires. Les grains de catécholamines perdent leur densité et se transforment en de volumineuses vacuoles renfermant un matériel finement granulaire puis floconneux.

Dès le début de la vacuolisation certaines cellules médullaires montrent une zone de Golgi très active donnant naissance à de nombreuses vésicules. On peut observer dans la même cellule des grains de morphologie différente (—►) l'un à centre dense et périphérie granulaire considéré comme étant riche en adrénaline, l'autre de matériel très dense excentré par rapport à sa membrane et considéré comme étant riche en noradrénaline.

G : zone de Golgi ; GC : grains de catécholamines ; V : vacuole.

Figure 79 : Poussin 13 jours. Prélèvement effectué 4 heures après 1 seule injection de Serpasil 0,25mg. Les cellules médullaires contiennent encore des grains de morphologie sensiblement normale, mais on constate que des vacuoles sont apparues dans le cytoplasme (cf. discussion dans le texte).
N : noyau ; L : lumière de vaisseau ; V : vacuole. (x 4 000)

Figure 80 : Poussin 13 jours. 1 injection de Serpasil 0,25mg.

Cellule médullaire vacuolisée et qui renferme encore quelques grains de catécholamines.

GC : grains de catécholamines ; N : noyau ; V : vacuole. (x 6 000)

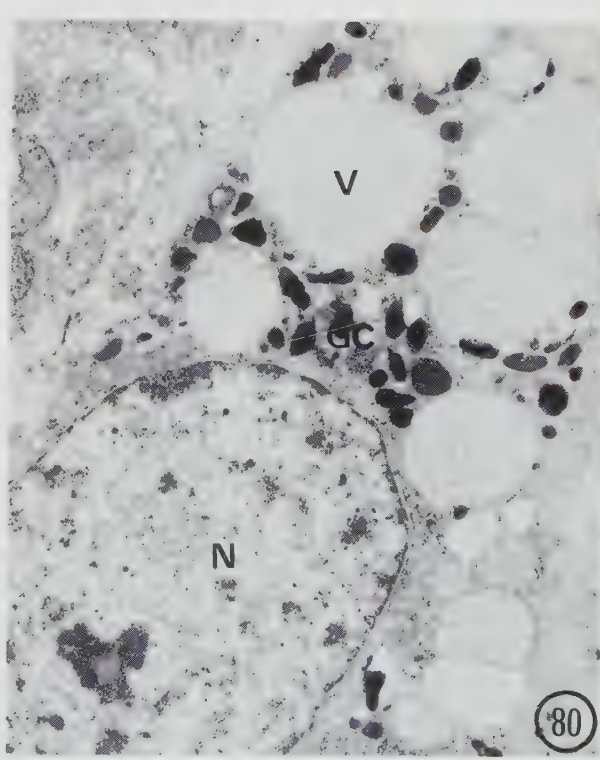
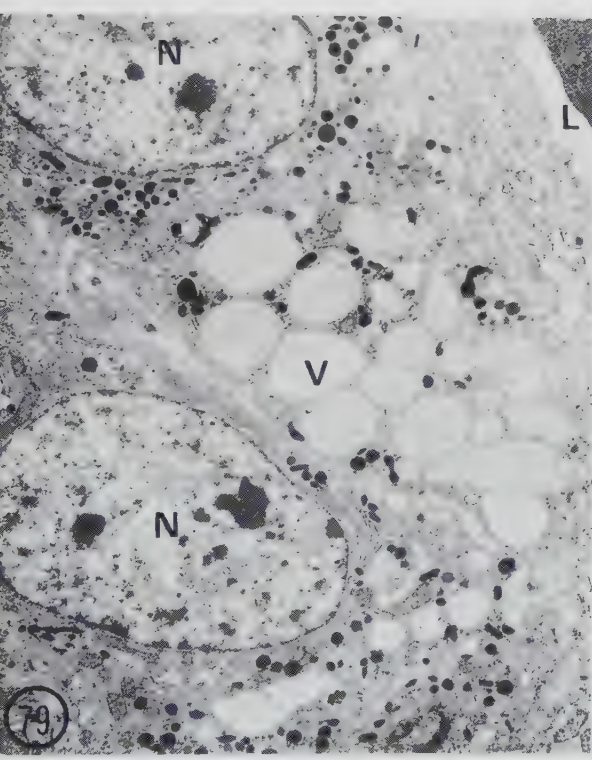
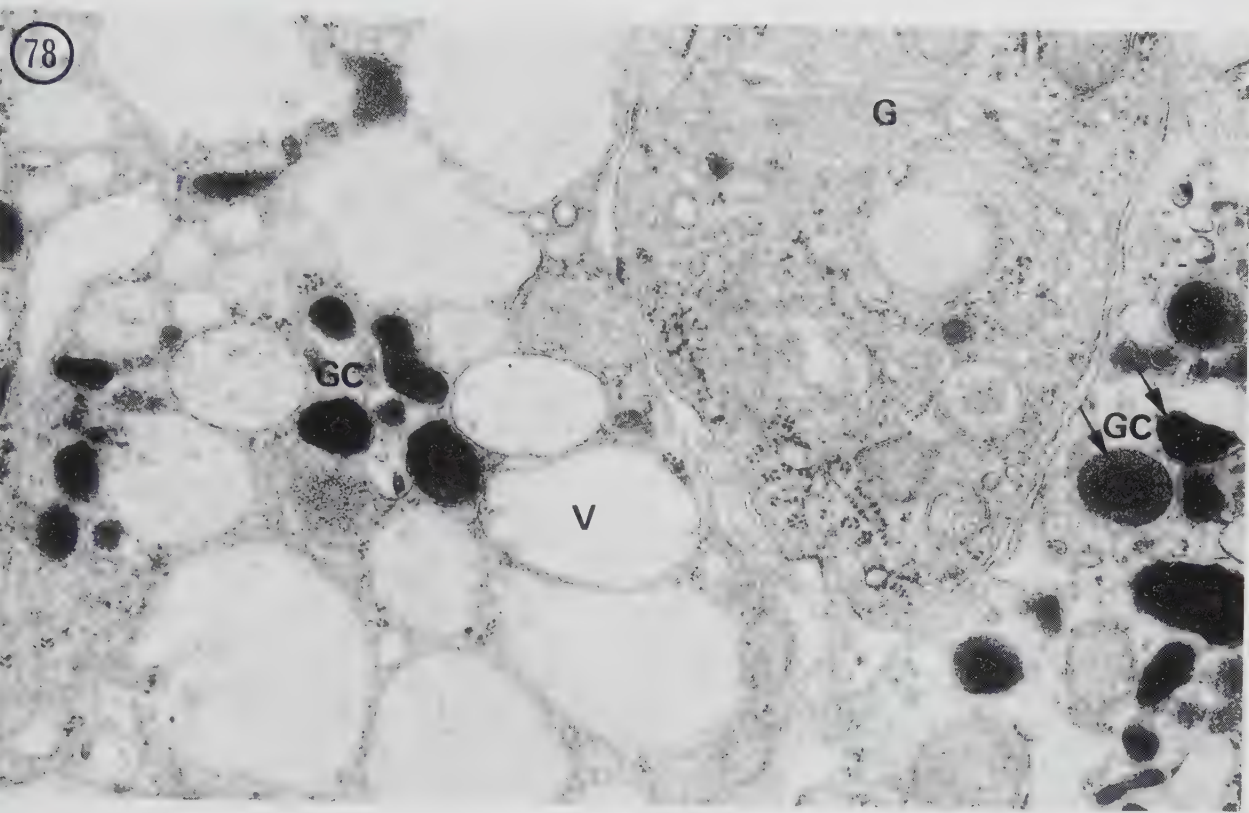


PLANCHE XXII

PLANCHE XXII

Figure 81 : Poulet 3 mois. Prélèvement effectué 4 heures après la 2ème injection de Serpasil 0,25mg par injection. La 1ère ayant été faite 24 heures auparavant. Cellules médullaires. L'une est très altérée, complètement dégranulée, son réticulum endoplasmique lisse est très dilaté. L'autre cellule renferme des granules de très petite taille nouvellement synthétisés.

CM : cellule médullaire ; H : hématie ; N : noyau. (x 2 000)

Figure 82 : Poulet 3 mois. Prélèvement effectué 4 heures après la 2ème injection de Serpasil 0,25mg par injection. Fixation Helly coloration trichrome de Masson.

Altérations profondes des cellules médullaires. La vacuolisation est très importante au niveau de ces cellules, les cordons corticaux sont intacts.

CC : cordon cortical ; CM : cellules médullaires ; Co : tissu conjonctif. (x 100)

Figure 83 : Embryon 20 jours d'incubation. 1 injection de Serpasil 0,10mg.

Cellule médullaire vacuolisée mais qui renferme encore des grains de catécholamines.

GC : grains de catécholamines ; N : noyau ; V : vacuole. (x 5 000)

Figure 84 : Poulet 3 mois. 48 heures après la 3ème injection de Serpasil 0,25mg par injection.

Cellules médullaires. A ce stade de "récupération" on peut observer des grains de catécholamines de deux catégories morphologiques : la première correspond à des grains qui sont tous sensiblement de même taille et de même densité. La seconde catégorie est constituée par des grains à centre clair et à périphérie dense, elle est uniquement rencontrée chez des embryons et des Poussins ayant reçu des injections de Serpasil. (cf. texte)

Er : ergastoplasme ; L : lumière de vaisseau ; N : noyau ; V : vacuole. (x 5 000)

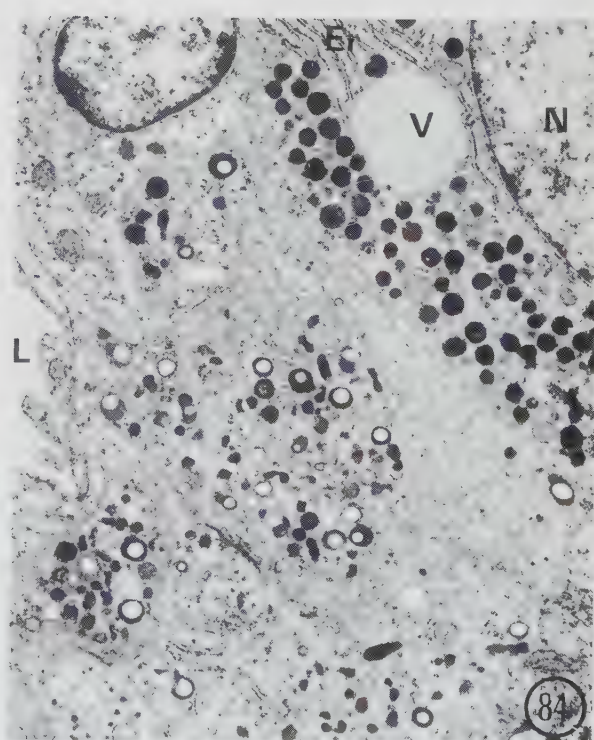
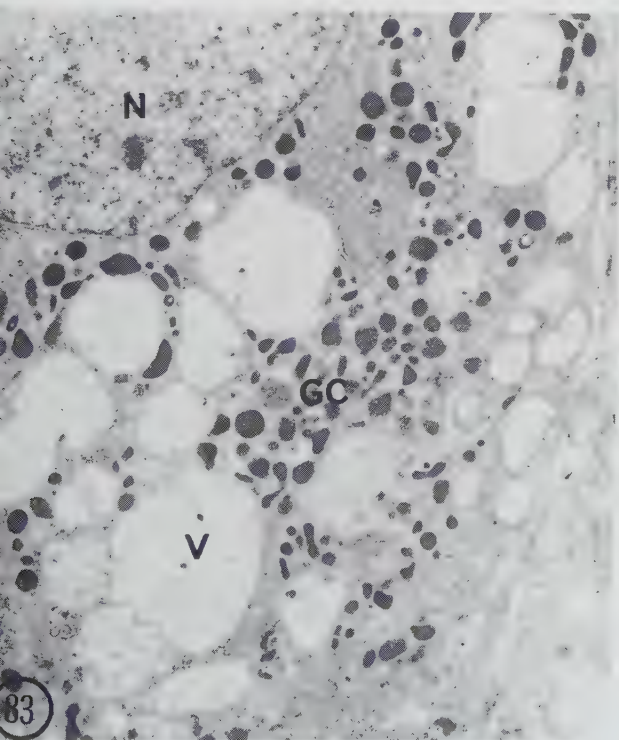
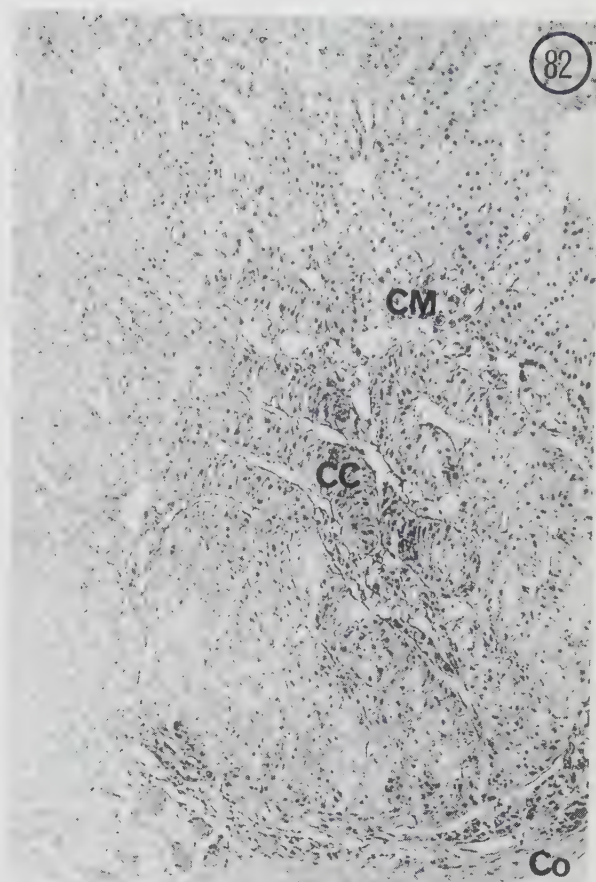
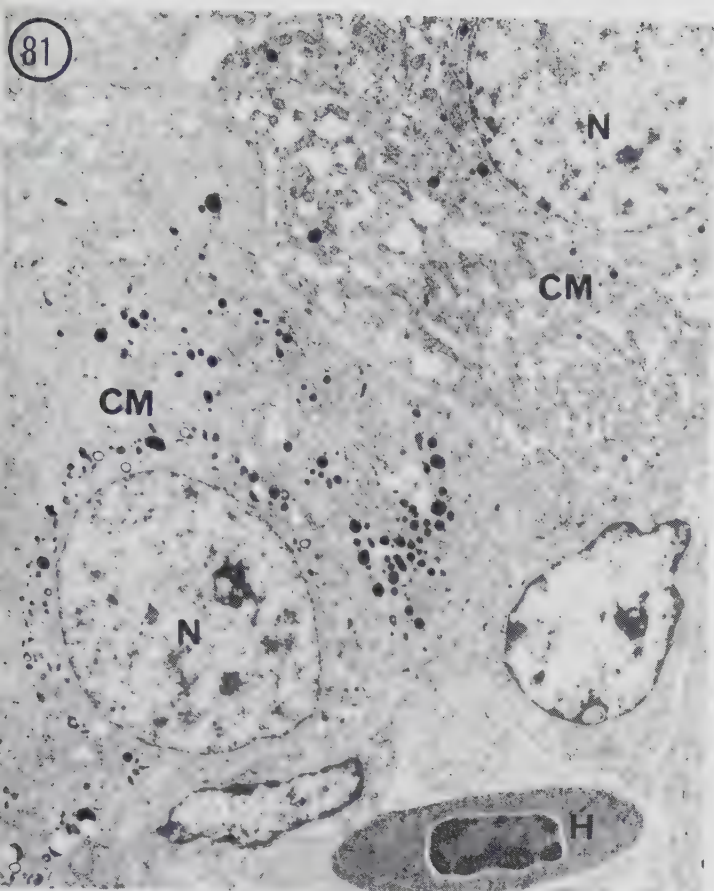


PLANCHE XXIII

PLANCHE XXIII

Mise en évidence de la noradrénaline par la réaction de TRAMEZZANI, CHIOCCHIO et WASSERMAN effectuée sur pièces. Coupes semi-fines.

Figure 85 : Poussin 1 jour. Témoin.

La réaction est très intense au niveau de certaines cellules médullaires.

CC : cordon cortical ; CM : cellules médullaires. (x 250)

Figure 86 : Poussin 1 jour. Prélèvement effectué 5 heures après 1 injection de Serpasil 0,10mg. On note la diminution de l'intensité de la réaction.

CC : cordon cortical ; CM : cellules médullaires. (x 250)

Figure 87 : Poussin 7 jours. Prélèvement effectué 30 heures après 1 injection de Serpasil 0,15mg. On note une diminution importante de l'intensité de la réaction.

CC : cordon cortical ; CM : cellules médullaires ; L : lumière de vaisseau. (x 250)

Figure 88 : Embryon 20 jours d'incubation. Prélèvement effectué 24 heures après 1 injection de Serpasil 0,10mg. La réaction est presque entièrement négative. De rares cellules médullaires (→) sont recouvertes d'un très faible précipité d'argent. La déplétion en noradrénaline est presque totale.

CC : cordon cortical ; CM : cellules médullaires ; L : lumière de vaisseau. (x 250)

Figure 89 : Poussin 1 jour ayant reçu une injection de Serpasil 0,10mg au stade embryon de 20 jours d'incubation.

La vascularisation est très importante (→). La réaction est positive seulement au niveau de quelques cellules médullaires. On observe également que les cordons corticaux ont augmenté de taille.

CC : cordon cortical ; CM : cellules médullaires. (x 160)

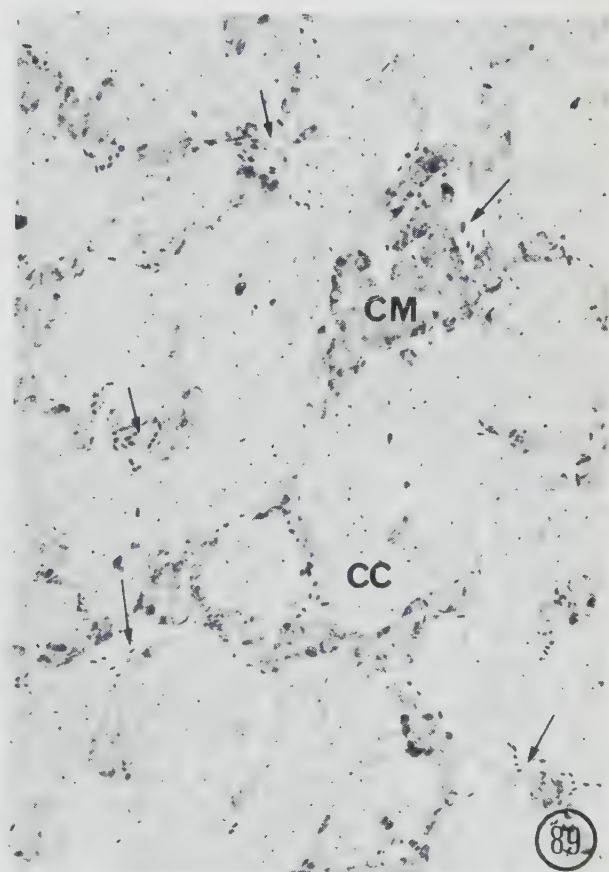
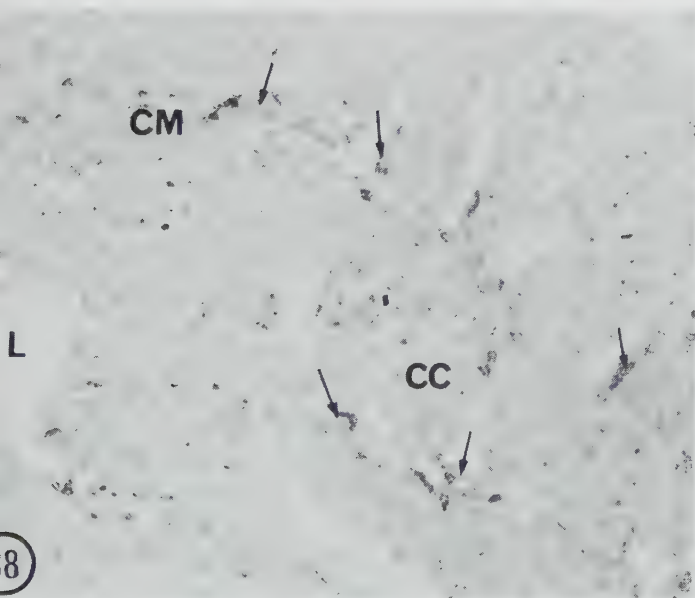
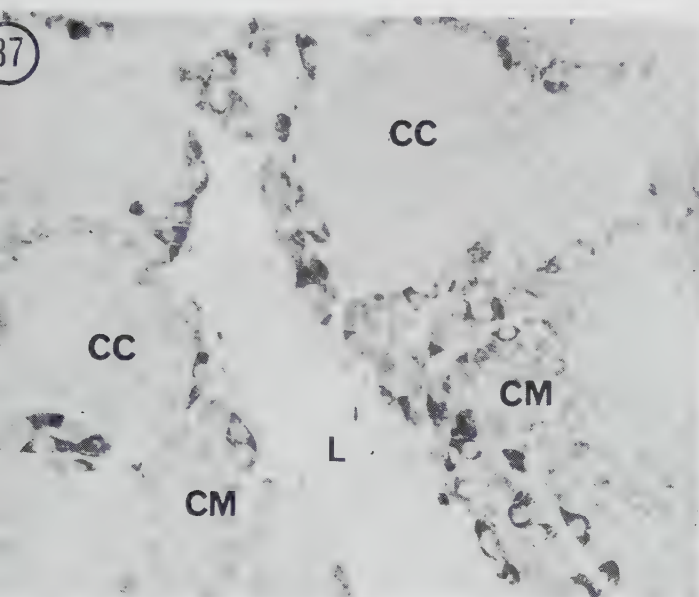
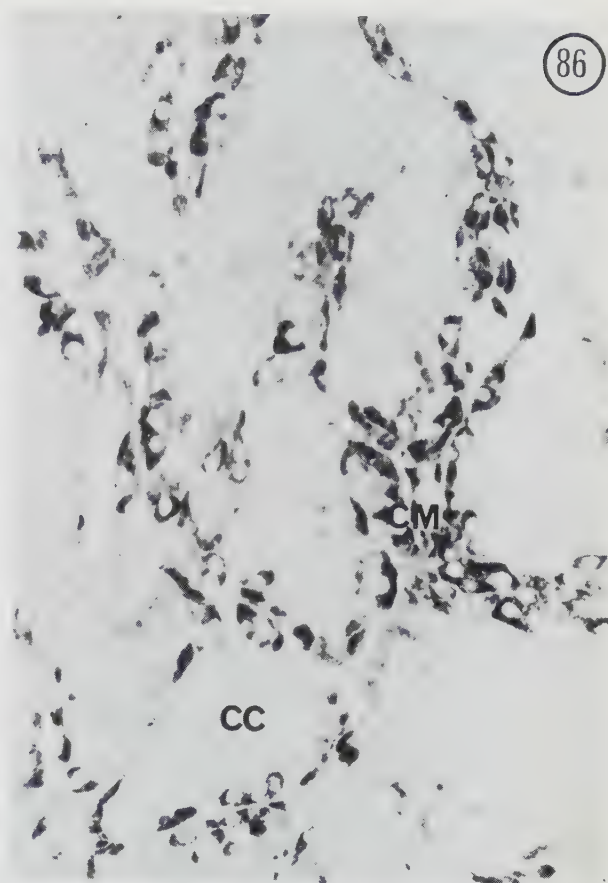
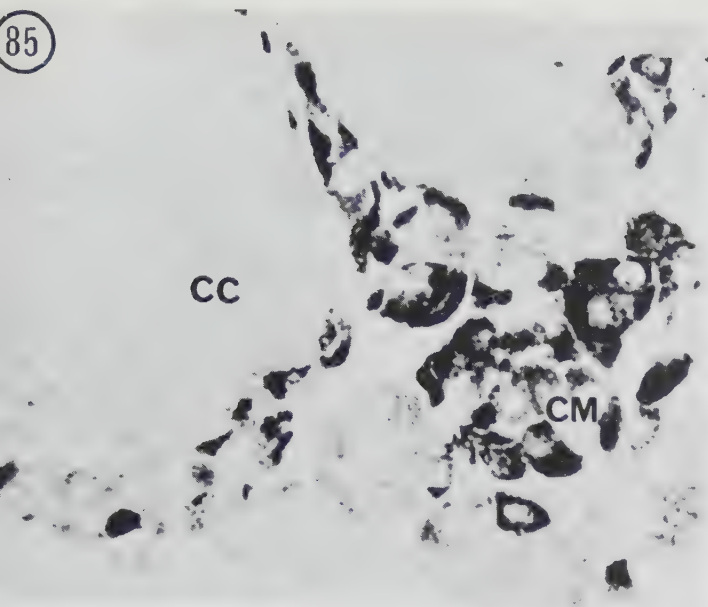


PLANCHE XXIV

PLANCHE XXIV

Figure 90 : Embryon 20 jours d'incubation. 42 heures après 1 seule injection de Serpasil 0,10mg.

Cellule médullaire présentant des signes d'activité intense.

L'appareil de Golgi est bien développé. De petits granules apparaissent dans le cytoplasme. On remarque le type morphologique de granule à centre clair et à périphérie dense, granulaire (—→) rencontré uniquement chez des embryons et Poussins injectés au Serpasil. On note également la localisation de l'ergastoplasme autour des mitochondries.

Er : ergastoplasme ; G : appareil de Golgi ; M : mitochondrie.

(x 14 000)

Figure 91 : Embryon 20 jours d'incubation 48 heures après 1 injection de Serpasil 0,10mg.

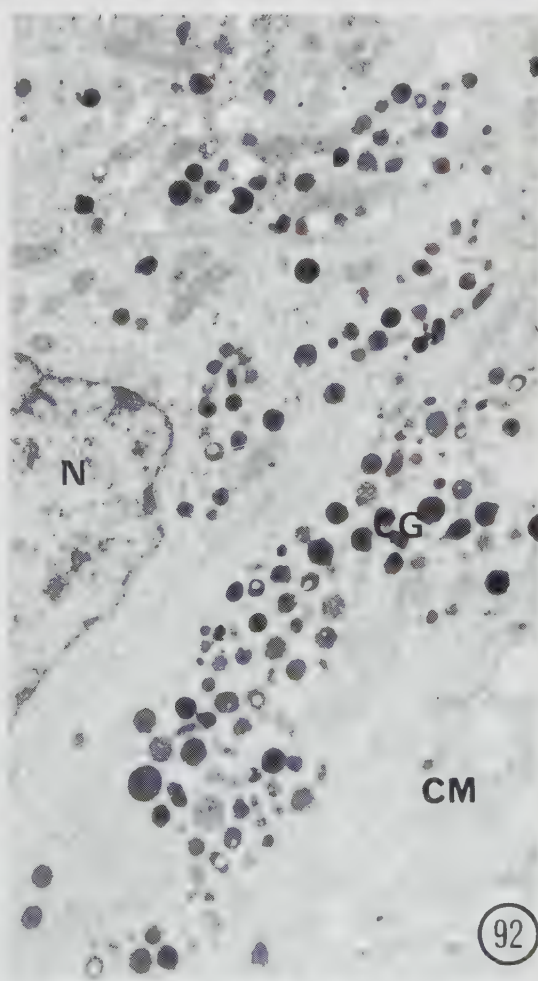
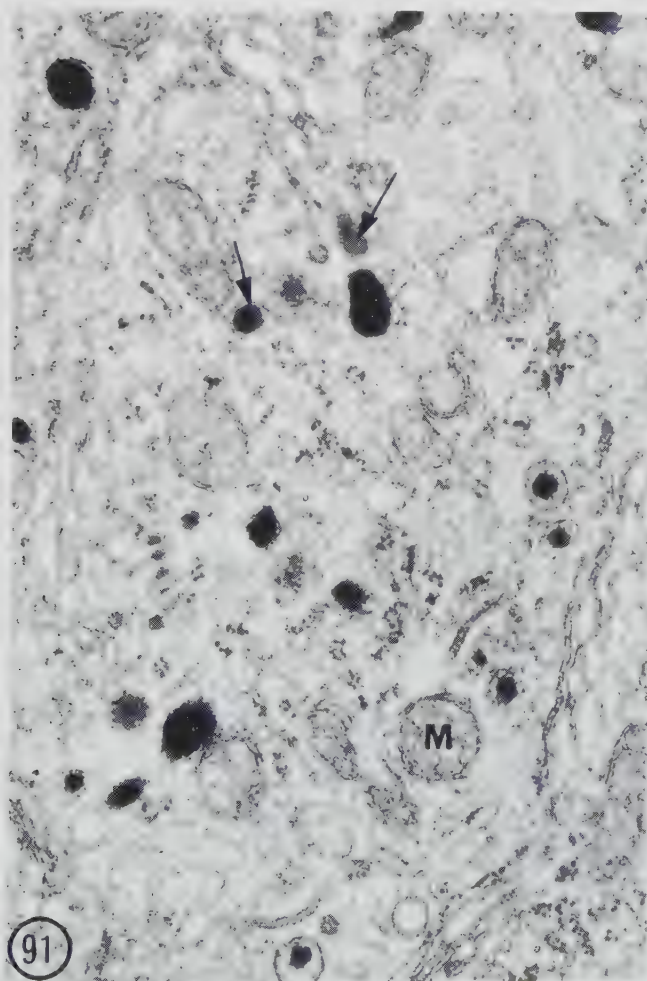
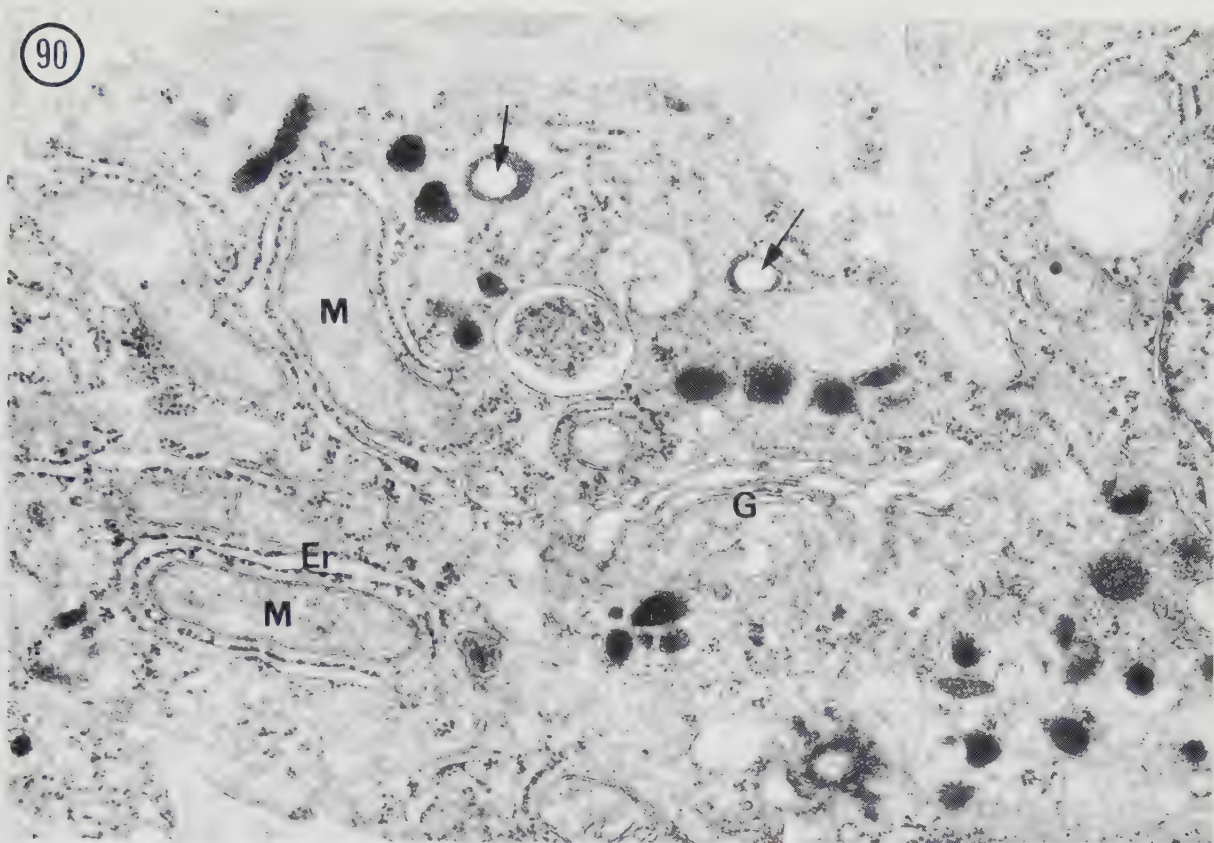
Cellule médullaire zone de Golgi. Les saccules golgiens donnent naissance à de très nombreuses vésicules qui se remplissent d'un matériel dense.

(—→)

M : mitochondrie (x 20 000)

Figure 92 : Poussin 6 jours ayant reçu au stade embryon 20 jours d'incubation une injection de Serpasil 0,10mg.

Stade de "récupération" où toutes les cellules médullaires sont semblables et renferment des granules qui sont sensiblement de même densité. (x 6 000)



La première correspond à des grains qui sont semblables : arrondis, de densité moyenne, de taille sensiblement égale. Ces grains n'ont ni la très forte densité, ni la morphologie des grains contenant de la noradrénaline. Leur morphologie et leur densité sont plus proches de celles des grains d'adrénaline.

Pour essayer de connaître leur nature, nous avons appliqué la réaction au complexe ammoniacal d'argent sur des prélèvements effectués chez des Poussins dans les mêmes conditions expérimentales.

L'observation de cette réaction en microscopie électronique montre que certains grains réduisent le nitrate d'argent et sont recouverts de précipité en quantité variable, tandis que d'autres ne sont recouverts par aucun précipité. Les cellules médullaires contenant les grains de cette catégorie renferment donc de la noradrénaline et de l'adrénaline.

La seconde catégorie est constituée par des grains à centre clair et à périphérie dense (Planche XXII Figure 84), elle est uniquement rencontrée 3 jours après les injections de Serpasil.

Le traitement par la réserpine n'a pas seulement agit au niveau des cellules médullaires, en effet les cellules corticales sont hypertrophiées et présentent des signes de stimulation : densification de la matrice mitochondriale, diminution du nombre d'inclusions lipidiques, développement des tubules du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi, augmentation du nombre de corps denses.

b) - Chez les embryons

Chez les embryons de 10 jours à 14 jours dont l'intensité de la réaction de mise en évidence de la noradrénaline était affaiblie, les altérations ultra-structurales consistent en une réduction générale de la densité des granules et en une augmentation du nombre de vésicules cytoplasmiques.

Les prélèvements pour lesquels l'intensité de la réaction du complexe ammoniacal d'argent était inchangée, ont révélé quelques altérations au niveau des grains : leur contenu de densité normale était séparé de leur membrane par un halo clair important. Dans ces cellules, les tubules ergastoplasmiques étaient dilatés et les vésicules existaient en plus grand nombre que chez les témoins.

Chez les embryons du 14ème au 20ème jour d'incubation, les altérations ultrastructurales qui suivent une injection, sont semblables à celles que l'on observe chez les Poussins traités par la réserpine.

5 heures après l'injection, la densité des grains osmiophiles est réduite. La vacuolisation des cellules médullaires est déjà très étendue alors qu'elle n'apparaissait qu'à la 12ème heure après l'injection chez les Poussins.

12 heures à 24 heures après l'injection, lorsque la réaction de TRA-MEZZANI est presque entièrement négative (Planche XXIII Figure 88), le contenu des grains est de densité réduite. De volumineuses vacuoles occupent la presque totalité du cytoplasme (Planche XXI Figure 78). Dès ce stade, (12 heures à 24 heures après l'injection) on observe des modifications réparatrices, (Planche XXI Figure 78) la zone golgienne est bien développée, l'appareil de Golgi fournit de nombreuses petites vésicules à contenu peu dense aux électrons.

Ces aspects sont observés pendant 4 jours chez les embryons expérimentaux. Pourtant dès la 48ème heure après l'injection, on remarque le type morphologique de granule à centre clair et à périphérie dense qui était rencontré plus tardivement chez les Poussins ayant reçu 2 ou 3 injections de Serpasil.

La glande surrénale embryonnaire semble plus lente à récupérer sa charge en catécholamines que la glande surrénale du Poussin :

6 jours après l'injection, toutes les cellules médullaires renferment des grains de morphologie semblable : arrondis, moyennement denses, à contenu très finement granuleux. Cet aspect est rigoureusement le même que celui observé chez les Poussins 3 jours après la fin du traitement par le Serpasil.

L'hypertrophie des cellules corticales que nous avons observée chez les Poussins, est retrouvée chez les embryons à partir du 13ème jour d'incubation. Les signes de stimulation sont présents dans tous les cordons corticaux à partir du 2ème jour après l'injection : augmentation de la taille du noyau et du nucléole, de la densité de la matrice mitochondriale, dilatation des crêtes tubulaires des mitochondries, diminution du nombre de liposomes, augmentation du nombre de tubules du réticulum endoplasmique.

D) - DISCUSSION

1°) - Certaines études expérimentales ultrastructurales des cellules de la médullosurrénale avaient été entreprises pour tenter d'élucider la façon

dont se faisait la déplétion des catécholamines. DE ROBERTIS et VAZ FERREIRA (1957) ont noté une augmentation du nombre de fusions entre la membrane du granule et la membrane cellulaire après stimulation du nerf splanchnique chez le Lapin. Pour les auteurs, ces fusions seraient des traces possibles de la libération des granules. ELFVIN (1968) a observé après expérimentation par la réserpine, dans les cellules qui présentent des signes de dégranulation, plus ou moins prononcée, des petites "mottes" de matériel dense situées sur la membrane cytoplasmique.

Dans notre matériel embryonnaire, et chez les Poussins, nous observons parfois des granules qui semblent adhérer à la membrane plasmique, mais le nombre de ces images n'augmente pas après injection de réserpine. A partir du 14ème jour d'incubation, l'administration de réserpine provoque régulièrement une libération des catécholamines qui entraîne une diminution importante, allant jusqu'à la disparition presque totale des réactions histochimiques.

Sur le plan ultrastructural, nous avons observé une réduction progressive de la densité des granules qui reflète donc la perte de catécholamines, puisque la densité du granule après fixation glutaraldéhyde-acide osmique vient de la réduction de l'acide osmique par le complexe glutaraldéhyde-noradrénaline. Lorsque les réactions histochimiques sont négatives, l'observation ultrastructurale montre que les membranes granulaires ne renferment plus qu'un matériel extrêmement fin, floconneux, peu dense aux électrons. Les catécholamines sont libérées de la cellule sans disparition des granules. Cette observation est en accord avec celles de YATES (1964), COTTE, MONNERON, MICHEL-BECHET et PICARD (1965) qui ont étudié les effets de la réserpine sur la médullosurrénale du Hamster.

2°) - Le traitement par la réserpine entraîne une perte des catécholamines des cellules médullaires chez le Poussin et chez l'embryon à partir du 14ème jour d'incubation. Ce traitement aboutit à une disparition presque totale de la noradrénaline et de l'adrénaline. Cette déplétion très sévère est accompagnée d'altérations structurales de la cellule. Le traitement n'a donc pas seulement provoqué la simple déplétion des catécholamines que nous cherchions à obtenir mais a entraîné des bouleversements cellulaires qui ne semblent pas uniquement dus à une libération de catécholamines. La réserpine a un effet cytotoxique auquel les cellules embryonnaires ont été

particulièrement sensibles : pendant la période du 10ème au 14ème jour, lorsque les réactions histochimiques de mise en évidence de noradrénaline sont inchangées, il existe cependant certaines altérations ultrastructurales : dilatation au niveau de la membrane granulaire et au niveau du réticulum endoplasmique lisse. Nous pensons que dans ce cas, il s'agit plus de l'effet toxique de la réserpine que de la réponse à une stimulation physiologique.

3°) - Le mécanisme d'action de la réserpine est complexe. Nous avons vu que ce traitement provoque non seulement une déplétion des catécholamines mais des modifications de la vascularisation, une vacuolisation des cellules et pendant la phase de récupération, l'apparition d'un nouveau type morphologique de grains à coque dense et à centre clair.

La réaction de TRAMEZZANI montre que la plupart de ces grains sont recouverts d'un précipité d'argent, ils renferment donc de la noradrénaline.

Ce nouvel aspect de grains n'est jamais rencontré au cours de l'histogenèse des cellules médullaires.

Les différents modes d'action de la réserpine ont été analysés au moyen d'expérimentations, d'injections de catécholamines radio-actives, d'ultra-centrifugations de médullosurrénale.

La réserpine a non seulement une action centrale transmise par la voie des splanchniques (MIRKIN 1961) mais aussi une action de blocage au niveau du stockage des catécholamines dans les grains : la réserpine empêche les catécholamines nouvellement synthétisées d'être incorporées dans les grains. [BERTLER, HILLARP et ROSENGREN (1961), CARLSSON, HILLARP et WALDECK (1962)].

BERTLER (1961) a montré qu'après injection de L Dopa à des Lapins réserpinés, on retrouve de la dopamine et de la noradrénaline libres dans le cytoplasme et non fixées dans les grains, alors que les amines formées à partir de Dopa injectée chez des Lapins normaux sont stockées par les granules. (BERTLER, HILLARP et ROSENGREN 1960). La réserpine aurait également une action sur la perméabilité de la membrane des grains et de la cellule, ces modifications entraîneraient la "fuite" continue des amines.

4°) - La disparition des grains osmiophiles est accompagnée d'altérations structurales de la cellule : vacuolisation, dilatation du réticulum endoplasmique qui persistent pendant 3 ou 4 jours. Avant même que la dégranulation soit complète, la cellule essaye de restaurer sa charge en caté-

cholamines. Les signes d'activité de synthèse sont souvent observés : grand développement de la zone de Golgi, formation d'un grand nombre de vésicules. Au cours de la phase de récupération, on ne distingue plus en microscopie électronique les deux aspects cellulaires habituellement observés à partir du 14^{ème} jour d'incubation. Toutes les cellules médullaires sont semblables, elles présentent les mêmes caractères morphologiques et histochimiques, elles sont donc dans le même état fonctionnel.

Nous avons donc retrouvé le monomorphisme cellulaire décrit en microscopie optique par COTTE, MONNERON, MICHEL-BECHET et PICARD (1965), après expérimentation par la réserpine chez le Hamster.

La réaction de TRAMEZZANI appliquée aux prélèvements effectués pendant cette phase de récupération révèle que toutes les cellules contiennent des grains marqués par un précipité d'argent et des grains non marqués. Pendant cette période où les cellules reconstituent leur charge, elles renferment toutes de la noradrénaline et de l'adrénaline. Toutes les cellules sont donc capables de réaliser la synthèse de l'adrénaline. Cette observation peut donc servir d'argument à la théorie uniciste. VITRY (1967) a conclu après une étude sur les effets de la réserpine et du choc insulinique sur le dimorphisme cellulaire de la médullosurrénale que celui-ci "ne paraît donc pas représenter au sens propre du terme une différenciation, liée à une élaboration préférentielle ou exclusive d'adrénaline ou de noradrénaline mais il caractérise les différentes modalités du fonctionnement fondamentalement identique de la cellule médullosurrénalienne".

5°) - Les effets de cette expérimentation n'ont pas porté exclusivement sur les cellules médullaires, en effet nous avons signalé que les cellules corticales embryonnaires ont présenté des signes d'hyperactivité.

De nombreux auteurs avaient déjà observé après traitement par la réserpine une stimulation corticosurrénalienne surtout au niveau de la fasciculée. (KHAZAN et Coll. 1961). COESSENS (1962) avait noté une augmentation de l'activité de la phosphatase acide et une déplétion du matériel soudanophile tandis que DE SHAEPDRYVER et PREZIOSI (1956) avaient constaté une chute d'acide ascorbique. BUGNON, LENYS et MOREAU (1964) ont décrit chez le Rat, une hypertrophie de la fasciculée ainsi qu'une déplétion en esclaves lipidiques.

Le taux de corticostérone plasmatique était augmenté chez le Rat ainsi que chez le Poulet (NEWCOMER 1962). D'autre part, on a remarqué que la réserpine provoquait une diminution du contenu de l'hypophyse en ACTH

(WESTERMANN 1961, MAICKEL et Coll. 1961) et GIROD (1963) a conclu que cette substance aurait une action sur les cellules corticotropes de l'hypophyse.

Les cellules corticales embryonnaires sont donc stimulées par une hypersécrétion de l'ACTH hypophysaire comme au cours du traitement par la métopirone mais le mécanisme de sécrétion est différent. Dans le cas du traitement par la métopirone, c'est la chute du taux de cortisol et de corticostérone qui déclenche la sécrétion de l'ACTH hypophysaire, dans le cas du traitement par la réserpine, cette substance a une action directe sur les cellules corticotropes de l'hypophyse.

Le fait que la stimulation des cellules corticales est observée à partir du 13ème jour d'incubation constitue un argument en faveur du fonctionnement de l'axe hypophysosurrénalien au 12ème jour de l'incubation.

CONCLUSIONS

Après avoir étudié la mise en place des constituants de la glande surrénale, nous avons analysé dans une première partie les aspects morphologiques et histochimiques des cellules corticales embryonnaires. Nous avons suivi l'évolution des caractères ultrastructuraux des organites cellulaires en observant plus particulièrement le réticulum endoplasmique lisse et les mitochondries, organites qui sont impliqués dans la stéroïdogénèse. Par ailleurs, le développement du réticulum endoplasmique lisse entre le 10ème et le 12ème jour, l'augmentation du nombre de mitochondries et de liposomes au 12ème jour, constituent des arguments en faveur du fait que les cellules corticales de la surrénale embryonnaire ont acquis leur maturité fonctionnelle au 12ème jour de l'incubation.

L'étude des caractères histochimiques de la corticosurrénale nous a permis de compléter le résultat précédent. En effet, les cellules corticales acquièrent précocement les caractères histochimiques de cellules susceptibles de stéroïdogénèse, en particulier le cholestérol est présent au 8ème jour de l'incubation et l'activité enzymatique $\Delta 5 - 3 \beta$ hydroxystéroïdodéshydrogénase est décelable au 5ème jour.

Ainsi cette première partie de notre travail nous amène-t-elle à admettre que les cellules corticales possèdent des caractères ultrastructuraux et histochimiques de cellules capables d'élaborer des stéroïdes à partir du 10ème jour de l'incubation.

Dans une seconde partie, nous avons particulièrement étudié la différenciation précoce des cellules médullaires. L'observation ultrastructurale des cellules sympathiques migratrices au 5ème jour, nous a révélé qu'elles contenaient des grains osmiophiles avant leur pénétration dans les ébauches corticales.

Nous pouvons distinguer dès le 6ème jour, deux types morphologiques de grains correspondant à des grains riches en noradrénaline et à des grains riches en adrénaline. A partir du 14ème jour d'incubation, ces grains ont tendance à être localisés dans des cellules différentes, mais tout au long du développement ces deux "types" de grains peuvent coexister dans la même cellule.

L'étude des caractères histochimiques des cellules médullaires menée à l'aide de techniques de mise en évidence des catécholamines totales et de

techniques spécifiques de la noradrénaline, nous a permis d'identifier la présence de noradrénaline dans les cellules sympathiques migratrices au 5ème jour de l'incubation, et la présence d'adrénaline au 6ème jour dans les cellules adrénales au contact des cordons corticaux. Les différentes techniques histochimiques utilisées ont abouti à la conclusion que pendant toute la période embryonnaire, et malgré la brusque augmentation de l'adrénaline en fin d'incubation, la noradrénaline est la catécholamine la plus abondante.

Enfin, l'application en microscopie électronique de la technique de TRAMEZZANI considérée comme spécifique de la noradrénaline a montré que les cellules médullaires contiennent à la fois des grains riches en noradrénaline et des grains riches en adrénaline. Ainsi avons nous pu apporter un argument intéressant en faveur de la théorie uniciste, selon laquelle toutes les cellules sont capables de transformer la noradrénaline en adrénaline.

Dans une troisième partie nous avons étudié les effets d'une stimulation des cellules corticales par un traitement par l'ACTH. Les modifications histochimiques et ultrastructurales permettent de dégager deux mécanismes différents de l'action de l'ACTH. Au cours du développement chez les embryons entre le 7ème et le 9ème jour de l'incubation, l'ACTH provoque une accélération de la différenciation des cellules corticales qui acquièrent plus vite que chez les témoins leurs caractères morphologiques spécifiques. Par contre, à partir du 13ème jour c'est l'activité sécrétrice elle même qui est stimulée. Ce résultat mérite d'être souligné car il illustre bien l'influence d'une hormone sur un processus de différenciation, la même hormone stimulant plus tard, ce qui est au demeurant banal, l'activité sécrétrice. Sur le plan endocrinien, par ailleurs, ce résultat nous a permis d'avancer que dès le 12ème jour de l'incubation, la surrénale peut réagir à une stimulation hormonale. Mais ceci ne permet pas d'affirmer qu'elle est naturellement stimulée dès ce 12ème jour.

Les résultats acquis après traitement par la Métopirone nous ont permis de franchir une étape complémentaire. En effet, ce traitement provoque des signes d'activation des cellules corticales à partir du 10ème jour (densification des mitochondries, augmentation du nombre de tubules du réticulum endoplasmique). On sait que cette action est indirecte et met en jeu le mécanisme de rétroaction du système hypothalamo-hypophysosurrénalien.

Nous sommes donc fondée à penser que ce système est mis en place dès le 10ème jour de l'incubation.

Enfin, au cours de l'étude expérimentale à l'aide de la réserpine, nous avons également observé une stimulation des cellules corticales à partir du 13ème jour d'incubation.

Nos trois types d'expérimentations avaient initialement des buts différents, mais il avaient cependant un point commun : tous trois ont abouti à une stimulation des cellules corticales par l'action de l'ACTH :

- stimulation directe par des injection d'ACTH.
- stimulation par l'ACTH endogène d'origine hypophysaire dont la sécrétion est déclenchée par la chute du taux de corticostérone et du cortisol, après blocage de leur synthèse par la Métopirone.
- enfin stimulation par l'ACTH endogène d'origine hypophysaire dont la sécrétion est déclenchée par l'action de la réserpine sur les cellules corticotropes de l'hypophyse.

Le regroupement des résultats obtenus permet bien de conclure que l'axe hypophysosurrénalien est mis en place à 10 jours et qu'il est fonctionnel au 12ème jour.

L'étude expérimentale portant sur les cellules médullaires a été réalisée au moyen de la réserpine. Nous avons suivi, sur le plan ultrastructural et sur le plan histochimique les différentes étapes de la déplétion des cellules (diminution de la densité des grains, vacuolisation, accompagnées de signes d'activité de synthèse). Nous avons souligné que la réserpine n'a pas seulement une action déplétive à partir du 14ème jour, mais également une action cytotoxique. Au cours de la période de restauration, toutes les cellules médullaires ont les mêmes caractères morphologiques et histochimiques. Cette observation constitue un argument supplémentaire à apporter à la théorie uniciste de PICARD.

BIBLIOGRAPHIE

ABEL J.J.

On a simple method of preparing epinephrine and its compounds.
Bull. Johns Hopkins Hosp. 1902, 13, 29-36.

ABRAHAM A., STAMMER A.

Untersuchungen Über die Struktur die mikroskopische Innervation und die Cholinesterase-aktivität der Nebenniere von Vögeln.
Acta. Biol. Szeged., 1959, 5, 85-95.

ADAMS A.E., HIRCHINSON V.

Growth retarding effect of reserpine on the Chick embryo.
Anat. Rec., 1959, 134, 699-724.

ADJOVI Y.

Morphogenèse et activité de la glande corticosurrénale de l'embryon de Poulet normal et décapité.
Arch. Anat. micr. Morph. exp., 1970, 59, 185-200.

ADJOVI Y., IDELMAN S.

Action d'un inhibiteur de la stéroïdogénèse : l'Elipten sur la cortico-surrénale de l'embryon de Poulet (Leghorn blanc).
C.R. Soc. Biol., 1969, 163, 2588-2593.

ALEXANDER.

1892 cité d'après DA COSTA 1952.

APPELGREN L. E.

Sites of steroid hormone formation.
Acta. physiol. Scand., 1967, suppl., 301, 1-107.

ARVY L.

Contribution à l'histochimie de la glande surrénale chez Gallus domesticus L. et chez Anas boschas.
C.R. Soc. Biol., 1961, 155, 69-71.

ARVY L.

Histo-enzymologie des glandes endocrines.
1963, Gauthier Villars Editeur.

ASHWORTH C.T., RACE G.J., MOLLENHAUER H.H.

Study of functional activity of adrenocortical cells with electron
microscopy.
Am. J. Pathol., 1959, 35, 425-437.

ASSENMACHER I., TIXIER-VIDAL A.

La réactivité à divers agents de l'axe hypophyse-testicule du Canard
traité à l'extrême début de la période réfractaire du cycle sexuel.
C.R., Soc. BIOL., 1962, 156, 267-272.

AYRES P.J., GOULD A.P., SIMPSON S.A., TAIT J.F.

The in vitro demonstration of differential corticosteroid production
with the Ox adrenal gland.
Biochem. J., 1956, 63, 19p.

BACCHUS.

1950 cité d'après GABE 1968.

BACHMANN R.

Die Nebennieren.
Möllendorffs Hdbch mikr. Anat. 1954, Springer Berlin, 1-965.

BAKER J.R.

Cité d'après LISON 1960.
Q. J. Micr. Sc., 1944, 85, 1.

BALFOUR F.M.

Cité d'après BACHMANN 1954.
Development of elasmobranch fishes.
1878, London, p. 237-247.

BANDER A.

Über zwei verschiedene chromaffine Zelltypen im Nebennierenmark und ihre Beziehung zum Adrenalin und Arterienolgehalt.

Anat. Anz., 1950, 97, suppl., 172-176.

BANDER A.

Über zwei chromaffine Zelltypen im Nebennierenmark und ihre Beziehung zum Vorkommen von Adrenalin und Arterienolgehalt.

Arch. exper. Path. u., Pharmakol., 1954, 223, 140-147.

BARGMANN W.

Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 6th ed.

Stuttgart., Georg., Thieme, 1967, 1-784.

BELT W.D., SHERIDAN M.N., KNOUFF R.A., HARTMAN F.A.

Fine structural study of a possible mechanism of secretion by the inter-renal cells of the brown Pelican.

Z. Zellforsch., mikrosk. Anat., 1965, 68, 864-873.

BELT W.D., PEASE D.C.

Mitochondrial structure in sites of steroid secretion.

J., Biophys., Biochem., Cytol., 1956, 2, (suppl.), 369-374.

BELT W.D.

The origin of adrenal cortical mitochondria and liposomes : a preliminary report.

J. Biophys. Biochem. Cytol., 1958, 4, 337-340.

BELT W.D.

Fine structural changes in the adrenal cortex of the Hamster during starvation.

Anat. Rec., 1960, 136, 162.

BENEDECKY J.

Electron microscopic study on the extracellular catecholamine granules in the adrenal medulla of the chicken.

Acta. agron. Acad. Sci. hungar., 1966, 15, 107-17

BENNETT H.S.

Cytological manifestations of secretion in the adrenal medulla.
Am. J. Anat., 1941, 69, 333-382.

BERCHTOLD J.P.

Action de la Métopirone sur le tissu interrénal d'un Urodèle, la
Salamandre tachetée (*Salamandra salamandra* L.).
C.R. Acad. Sci., 1966, 262, 382-5.

BERTLER A., HILLARP N.^oA., ROSENGREN E.

Some observations on the synthesis and storage of catecholamines in the
adrenal cells of the suprarenal medulla.
Acta. Physiol. Scand., 1960, 50, 124-131.

BERTLER A., HALL G., HILLARP N.^oA., ROSENGREN E.

Uptake of dopamine by the storage granules of the adrenal medulla in vitro
Acta. Physiol. Scand., 1961, 52, 167-170.

BIANCHI M., FARGIER M.C.

Etude dans le temps de l'effet de la réserpine sur la médullosurrénale.
C.R. Soc. Biol., 1962, 156, 1797-1802.

BIEDL

1903. Cité d'après DA COSTA 1952.

BIEDL

1910. Cité d'après DA COSTA 1952.

BJERSING L.

On the ultrastructure of granulosa lutein cells in porcine corpus luteum.
Z. Zellforsch., mikrosk. Anat., 1967, 82, 187-211.

BLANCHETTE E.J.

Ovarian steroid cells. II the lutein cells.
J. Cell. Biol., 1966, 31, 517-542.

BLASCHKO H.

The specific action of L. Dopa decarboxylase
J. Physiol. London, 1939, 96, 508-518.

BLASCHKO H., HAGEN P., WELCH A.D.

Observations on the intracellular granules of the adrenal medulla.
J. Physiol. London, 1955, 129, 27-49.

BONHOMMET M., WENIGER J.P.

Sécrétion de corticostéroïdes par la surrénale embryonnaire de Poulet
cultivée in vitro.
C.R. Soc. Biol., 1967, paru 1968, 161, 2052-5.

BOROWICZ J.W.

Some ultrastructural changes in adrenal cortical cells of Rat after
hypophysectomy and following ACTH administration.
Beitr. Pathol. Anat., 1965, 132, 441-468.

BOUCEK R.J., GYORI E., ALVAREZ R.

Steroid deshydrogenase reactions in developing Chick adrenal and gonadal
tissues. A histochemical study.
Gen. and comp. endocrinol., 1966, 7, 292-303.

BRANSOME E.D.

Incorporation of amino acids into Rat adrenal protein in vivo. Effects of
adrenocorticotropin and growth hormone.
Endocrinology, 1963, 74, 496-497.

BRAUER A.

A topographical and cytological study of the sympathetic nervous
components of the suprarenal of the Chick embryo.
J. Morphol., 1932, 53, 277-325.

BRAUNSTEINER H., FELLINGER K., PAKESCH F.

Elektronen mikroskopische Beobachtungen der Mitochondrien in der Zona
fasciculata der Nebennierenrinde.
Wien. Z. inn. Med., 1955, 36, 281-288.

BREZZI V.

Ricerche sull'istogenesi delle ghiandole surrenali negli ucelli.
Arch. Ital. Anat. Embryol., 1940, 44, 551-555.

BRUNN (Von) A.

Arch. mikroskop. Anat. u. Entwicklungsmech., 1872, 8, 618-638.

BUGNON C.

Path. et Biol., 1961, 9, 113.

BUGNON C., LENYS D.

Les modifications du cortex surrénalien de la Souris blanche soumise aux effets de la thyroxine, du benzylthiouracile ou de la Métopirone. Intérêt de leur confrontation avec celles obtenues chez le Rat blanc.
Ann. Sci. Univ. Besançon. Med., 1964, N°9, 117-28.

BUGNON C., LENYS D., LENYS R.

Métopirone, spiro lactone et zonation fonctionnelle de la surrénale de Rat.
Ann. Sc. Univ. Besançon, 2e ser., Med., 1962, 6, 145-157.

BUGNON C., LENYS D., MOREAU N.

Les variations morphologiques de l'axe hypophyso-surrénalien du Rat blanc traité par la réserpine isolée ou associée au benzylthiouracile ou à la thyroxine.
Ann. Sc. Univ. Besançon. Med., 1964, N°9, 129-40.

BUSH I.E.

J. Endocrinol., 1953, 9, 95.

CAIN A.J.

Cité d'après LISON 1960.
Q. J. micr. Sc., 1947, 88, p. 383.

CALLINGHAM B.A., MANN M.

Adrenaline and noradrenaline content of the adrenal gland of the Rat following depletion with reserpine.
Nature, London 1958 a, 181, 423-424.

CALLINGHAM B.A., MANN M.

Replacement of adrenaline and noradrenaline in the innervated and denervated adrenal of the Rat, following depletion with reserpine. Nature, London 1958 b, 182, 1020-1021.

CAMANNI F., LOSANA O., MOLINATTI G.M.

Selective depletion of noradrenaline in the adrenal medulla of the Rat after administration of reserpine (histochemical research.) Experimentia, Basel 1958, 14, 199-201.

CANNATA M.A., CHIOCCIO S.R., TRAMEZZANI J.H.

Specificity of the glutaraldehyde silver technique for catecholamines and related compounds. Histochemie., 1968, 12, 253-264.

CARR I.A.

Microvilli of cells of the human adrenal cortex. Nature, London 1958, 182, 607-608.

CARR I.A.

The ultrastructure of the human adrenal cortex before and after stimulation with ACTH. J. Path. Bact., 1961, 81, 101-106.

CARLSSON A., FALCK B., HILLARP N.^oA.

Cellular localization of brain monoamines. Acta Physiol. Scand., 1962, 56, suppl. 196.

CARLSSON A., HILLARP N.^oA.

Release of adrenaline from the adrenal medulla of rabbits produced by reserpine. Kungl. Fysiogr. Sällsk. Lund. Förh., 1956, 26, 1-2.

CARLSSON A., HILLARP N.^oA., WALDECK B.

A Mg⁺⁺ ATP dependent storage mechanism in the amine granules of the adrenal medulla. Med. exp., 1962, 6, 47-53.

CASE J.F.

Adrenocortical anterior pituitary relationships during embryonic life.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 1952, 55, 147-158.

CASTANÉ-DECOUD A., PEDERNERA E., NARBAITZ R.

Accion del ACTH sobre la suprarrenal del embrion de pollo.
Rev. Soc. argent. Biol. 1964, 40, 181-6.

CHATTERJEE A.

Effect of reserpine on adrenal cortical activity in Rats.
Endokrinologie, 1965, 48, 265-8.

CHAUFFARD

1912. Cité d'après DA COSTA 1952.

CHESTER JONES I.

The adrenal cortex.
Cambridge Univ. Press. 1957, 316 p.

CHESTER JONES I.

Variation in the mouse adrenal cortex with special reference to the
Zona reticularis and to brown degeneration, together with a discussion
of the "cell migration" theory.
Q. J. micr. Sci., 1948, 89, 53.

CHIEFFI G., MANELLI H., BOTTE V., MASTROLIA L.

Il differenziamento istochimico dell'interrenale e dei tessuti somatici
della gonade embrionale di pollo : comportamento della steroide - 3β
olo deidrogenasi.
Acta. Embryol. Morphol. exp., 1964, 7, 89-91.

CHIFFELLE T.L., PUTT F.A.

Cité d'après LISON 1960
Stain Technol. 1951, 26, p. 51

CHRISTENSEN A.K.

The fine structure of testicular interstitial cells in guinea pigs.
J. Cell. Biol., 1965, 26, 911-935.

CIER J.F., PEYRIN L.

La méthylation de la noradrénaline dans le tissu surrénal. Etude in vitro
à l'aide de la C¹⁴ noradrénaline.
J. Physiol. Paris, 1962, 54, 537-547.

CLEMENTI F., ZOCCHÉ G.P.

Morphological studies on the catecholamine synthesis in the adrenal medulla.
Electron microscopy. Acad. Press. New-York, 1962.

CLEMENTI F., ZOCCHÉ G.P.

Morphological and pharmacological effects of reserpin given alone or after
iproniazid, on the catecholamines of the adrenal glands of the Rat.
J. Cell. Biol., 1963, 17, 587-596.

COESSENS R.

Action histochimique de l'action aiguë et prolongée de la réserpine sur
la corticosurrénale du Rat.
C. R. Soc. Biol. 1962, 156, 974-976.

COHEN A.

Correlations entre l'hypophyse et le cortex surrénal chez le fœtus de
Rat. Le cortex surrénal du nouveau-né.
Arch. Anat. micr. Morphol. exp. 1963, 52, 277-407.

COHERE G., BRECHENMACHER C., MAYER G.

Variations des ultrastructures de la cellule luteale chez la Ratte au
cours de la grossesse.
J. Microscopie 1967, 6, 657-670.

COTTE G., MICHEL-BECHET M., HAON A.M.

Ultrastructure de la corticosurrénale du Hamster après injection de
réserpine.
Colloque de Microscopie Electronique, Strasbourg 1964, vol. des résumés
p. 40

COLLENOT G. OZON R.

Mise en évidence biochimique et histochimique d'une $\Delta 5 - 3\beta$ hydroxystéroïde déshydrogénase dans le testicule de *Scylliorhinus canicula* L.

Bull. Soc. Zool., 1965, 89, p. 577-585

DA COSTA CELESTINO A.

Le cortex surrénal

1952, Masson, Paris.

COTTE G., MONNERON A., MICHEL-BECHET M., PICARD D.

Effets de la réserpine sur la médullosurrénale du Hamster doré.

C. R. Ass. Anat., 1965, 125, 485-493.

COTTE G., COTTE N.

Etude ultrastructurale d'images de fonte holocrine dans la corticosurrénale.

Z. Zellforsch., 1961, 54, 182-198.

COTTE G., MICHEL-BECHET M., PICARD D., HAON A.M.

Cytophysiole ultrastructurale de la médullosurrénale et hypoglycémie insulinique.

C.R. Ass. Anat., 1966, 131, 301-9

COTTE G., MICHEL-BECHET M., PICARD D., HAON A.M.

Etude comparative en microscopie électronique de la corticosurrénale du Cobaye, de la Lapine et du Hamster.

Ann. Endocr. Paris., 1963, 24, 1040-1043.

COUPLAND R.E.

On the morphology and adrenaline - noradrenaline content of chromaffin tissue.

J. Endocrin., 1953, 9, 194-203.

COUPLAND R.E.

Observations on the chromaffin reaction.

J. ANAT., 1954, 88, 142-151.

COUPLAND R.E.

The catecholamine content of the adrenal medulla of the Rat following reserpine induced depletion.

J. Endocrin., 1959, 18, 154-161

COUPLAND R.E.

Electron microscopic observations on the structure of the Rat adrenal medulla I. The ultrastructure and organization of chromaffin cells in the normal adrenal medulla. II. Normal innervation.

J. Anat., London 1965, 99, 231-272.

COUPLAND R.E.

Corticosterone and methylation of noradrenalin by extrarenal chromaffin tissue.

J. Endocr., 1968, 41, 487-490.

COUPLAND R.E., HOPWOOD D.

Mechanism of a histochemical reaction differentiating between adrenaline and noradrenaline storing cells in the electron microscope.

Nature, London, 1966, 209, 590-591.

COUPLAND R.E., MAC DOUGALL J.D.B.

Adrenaline formation in noradrenaline storing chromaffin cells in vitro induced by corticosterone.

J. Endocr. G. B., 1966, 36, 317-23.

CRAMER W.

Further observations in the thyroid adrenal apparatus.

A histochemical method for the determination of adrenaline granules in the suprarenal gland.

J. Physiol. London 1918, 52, 8-12.

DAHL E. P.

The fine structure of nuclear inclusion.

J. Anat. 1970, 106, 255-262.

DANIEL J.Y.

Dosage des corticostéroïdes dans la surrénale du Canard de Pékin mâle.

Ann. d'Endocrinol. Paris 1970, 31, 209-216.

DAWSON A.B.

Histochemical evidence of early differentiation of the suprarenal gland of the chicken.

Anat. Rec., 1949, 105, 602.

DAWSON A.B.

Histochemical evidence of early differentiation of the suprarenal gland of the chick.

J. morph., 1953, 92, 579-595.

DEANE H.W., GREEP R.O.

A morphological and histochemical study of the Rat's adrenal cortex after hypophysectomy, with comments on the liver.

Am. J. Anat., 1946, 79, 117-146.

DEANE H.W., SHAW J.H.

Cytochemical study of adrenal in hypo and hyperthyroidism.

J. Nutr., 1947, 34, 1-19.

DEANE H.W., SHAW J.H., GREEP R.O.

The effect of altered sodium on potassium intake on the width and cytochemistry of the Zona glomerulosa of the Rat's adrenal cortex.

Endocrinology 1948, 43, 133-153.

DEMIS A.J., BLASCHKO H., WELCH A.D.

The conversion of déhydroxyphenylalamine -2 C¹⁴ (Dopa) to norepinephrine by bovine adrenal medullary homogenates.

J. Pharmacol., 1956, 117, 208-212.

DESCLIN L.

Influence de la réserpine sur la glande mammaire du Rat normal, du Rat hypophysectomisé ou du Rat hypophysectomisé porteur d'une greffe hypophysaire dans la capsule du rein.

C.R. Soc. Biol., 1957, 151, 1774-1776.

DEXTER R.N., FISHMAN L.M., NEY R.L., LIDDLE G.W.

An effect of adrenocorticotrophic hormone on adrenal cholesterol accumulation.

Endocrinology, 1967, 81, 1185.

DINER O.

L'expulsion des granules de la médullosurrénale chez le Hamster.

C.R. Acad. Sc. Paris, 1967, 265, 616-619.

EADE N.R.

Differential sedimentation of noradrenaline in homogenates of adrenal medullary granules.

J. Physiol. London 1956, 132, 53-54.

EADE N.R.

The distribution of the catecholamines in homogenates of the bovine adrenal medulla.

J. Physiol. London, 1958, 141, 183-192.

ELFVIN L.G.

The fine structure of the cell surface of chromaffin cells in the Rat adrenal medulla.

J. Ultrastruct. Res., 1965, 12, 263-286.

ELFVIN L.G.

The development of the secretory granules in the Rat adrenal medulla.

J. Ultrastruct. Res., 1967, 17, 45-62.

ELFVIN L.G.

Effects of reserpine on the surface structure of chromaffin cells in the Rat adrenal medulla.

J. Ultrastruct. Res. U.S.A. 1968, 21, 459-73.

ELFTMAN H.

Cité d'après GABE 1968

Anat. Rec., 1954, 118.

ENEMAR A., FALCK B., HÅKANSON R.

Observations on the appearance of norepinephrine in the sympathetic nervous system of the Chick embryo.
Develop. Biol., 1965, 11, 268-283.

ERANKO O.

On the histochemistry of the Rat adrenal medulla.
Acta. Physiol. Scand., 1951, 25, suppl. 89.

ERANKO O.

On the biochemistry of the adrenal medulla of the Rat, with special reference to acid phosphatase.
Acta. Anat., 1952, 16, suppl. 179.

ERANKO O.

Histological sampling, chromatographic separation and determination of adrenaline and noradrenaline in the adrenal medulla.
Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. 1954, 32, 392-401.

ERANKO O.

Distribution of adrenaline and noradrenaline in the adrenal medulla.
Nature, 1955 a, 175, 88-89.

ERANKO O.

Histochemistry of noradrenaline in the adrenal medulla of Rats and Mice.
Endocrinology, 1955 b, 57, 363-368.

ERANKO O.

Distribution of fluorescing islets adrenalin and noradrenalin in the adrenal medulla of the Hamster.
Acta. Endocrin., 1955 c, 18, 174-179.

ERANKO O.

Distribution of adrenalin and noradrenalin in the hen adrenal medulla.
Nature, London 1957, 179, 417-418.

ERANKO O., HOPPU V.

Effect of reserpine on the histochemistry and content of adrenalin and noradrenalin in the adrenal medulla of the Rat and Mouse.
Endocrinology, 1958, 62, 15-23.

ERANKO O., LEMPINEN M., RAISANEN L.

Adrenaline and noradrenaline in the organs of Zuckerhendl and adrenals of newborn Rats treated with hydrocortisone.
Acta. Physiol. Scand., 1966, 66, 253-254.

- FALCK B., HILLARP N.⁵A., THIEME G., TORP A.
Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde.
J. Histochem. Cytochem., 1962, 10, 348-354.
- FALCK B., TORP A.
A fluorescence method for histochemical demonstration of noradrenalin in the adrenal medulla.
Med. Exptl., 1961, 5, 429.
- FALCK B., TORP A.
New evidence for the localization of noradrenaline in the adrenergic nerve terminals.
Med. Exp. 1962, 6, 169-172.
- FARBER E., STERNBERG W.H., DUNLAP C.E.
Histochemical localization of specific oxidative enzymes, tetrazolium stains for diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase.
J. Histochem., 1956, 4, 254-265.
- FARESE R.V.
Changes in adrenal polysomes following ACTH administration.
Endocrinology 1965, 77, 128-136.
- FAWCETT D.W.
An Atlas of fine structure. The cell its organelles and inclusions.
1966, W. B. Saunders, Co, Philadelphia.
- FAWCETT D.W., LONG J.A., JONES A.L.
The ultrastructure of endocrine glands.
Recent. Progr. Hormone Res. 1969, 25, 315-80.
- FEULGEN R., VOIT K.
Cité d'après LISON 1960
Pflüg. Arch., 1924, 206, 389.
- FLETCHER J.R.
Light and electron microscopic studies of the effect of reserpine on the adrenal medulla of the guinea pig.
Exp. Cell. Res., 1964, 36, 579-91.
- FORTIER A., LEDUC J., d'IORLO A.
Biochemical composition of the chromaffin granules of the medulla.
Rev. Canad. Biol., 1959, 18, 110-114.
- FRANCO N., GUEDENET J.C., GRIGNON G.
Etude de l'adénohypophyse du Poussin après traitement par le propylthiouracile.
Coll. Soc. Française de Microscopie électronique, Caen 1971, volume des résumés 58 a.
- FRANKEL A.J., GRABER J.W., NALBANDOV A.V.
Adrenal function in cockerels.
Endocrinology 1967, 80, 1013-9.

FREEDMAN S.L.

The innervation of the suprarenal gland of the fowl (*Gallus domesticus*).
Acta. Anatom. 1948, 69, 18-25.

FREEDMAN B.M.

Depletion of ascorbic acid from the adrenal of the intact embryo of *Gallus domesticus* by adrenocorticotrophic hormone at histamine.
Comp. Biochem. Physiol., 1968, 24, 905-914.

FREEDMAN B.M.

The effects of adrenocorticotrophic hormone acid in the normal and bursectomized fowl.
Comp. Biochem., Physiol., G. B. 1970, 32, 755-61.

FUGO N.W.

Effects of hypophysectomy in the Chick embryo.
J. Exp. Zool., 1940, 85, 271-297.

FUJITA H.

An electron microscopic study of the adrenal cortical tissue of the domestic fowl.
Z. Zellforsch. Mikr. Anat. Dtsch. 1961, 55, 80-8.

FUJITA H., MACHINO M.

Electron microscopic observations on the secretory granules of the adrenal medulla of domestic fowl.
Arch. Histol. Japon 1962, 23, 67-77.

FUJITA H., MACHINO M., TOKURA H.

Some observations on the fine structure of the adrenal cortical cell of domestic fowl.
Arch. Histol. Japon, 1963, 24, 77-89.

FUSARI R.

Contribution à l'étude du développement des capsules surrénales et du sympathique chez le Poulet et les Mammifères.
Arch. Ital. Biol., 1893, 18, 161-182.

GABE M.

Techniques histologiques.
1968, Masson, Paris.

GABRILOVE J.L., NICOLIS G.L., GALLAGHER T.F.

J. Clin. Endocrinol., 1967, 27, 1337-40.

GAUDRAY A.

Action de la métopirone sur la glande surrénale de la Grenouille verte *Rana esculenta* L.
C.R. Soc. Biol. 1968, 162, 381-3.

GERARD P., CORDIER R., LISON L.

Sur la nature de la réaction chromaffine.
Bull. Histol. appl. 1930, 7, 133-139.

GHOSH A.

A comparative study of the histochemistry of the avian adrenals.
Gen. Comp. Endocr., 1962, suppl. 1, 75-80

GHOSH A., GHOSH A.

A comparative cytochemical study of the avian suprarenal medulla.
Proc. Zool. Soc., 1962, 15, 135-145.

GIACOMELLI F., WIENER J., SPIRO D.

Cytological alterations related to stimulation of the zona glomerulosa of the adrenal gland.
J. Cell. Biol., 1965, 26, 499-521.

GIACOMINI E.

Sur les terminaisons nerveuses dans les capsules surrénales des Oiseaux.
Arch. Ital. Biol. 1898, 29, 482-483.

GIROUD C.

Influence de la réserpine sur l'axe hypophyso-cortico-surrénalien chez le *Singe macacus sylvanus* L.
C.R. Acad. Sci., 1963, 256, 1600-1602.

GIROUD C., DUBOIS P., CURE M.

Identification expérimentale des cellules corticotropes antéhypophysaires chez le Hamster doré. (*Mesocricetus auratus waterh.*) ; observations au microscope optique et au microscope électronique.
C.R., Acad. Sci., 1964, 259, 1229-1232.

GIROUD A., LEBLOND C.P.

Localisation histochimique de la vitamine C dans le cortex surrénal.
C.R. Soc. Biol., 1934, 115, 705-706.

GOORMAGHTICH N.

Organogenèse et histogenèse de la capsule surrénale et du plexus coeliaque.
Arch. Biol. Liège, 1921, 30, 83-165.

GOORMAGHTICH N.

Surrénales et thermo-régulation. Tests morphologiques d'activité médullaire surrénale.
Arch. Biol. 1931, 41, 109-142.

GRANT J.K.

The biosynthesis of the adrenocortical steroids.
Biochem. Soc. Symp. Cambridge. Engl., 1960, 18, 24-39.

GRANT J.K., GRIFFITHS K.

In Currie A.R. Symingtons T. and Grant J.K. Eds.
The Human adrenal Cortex.
Livingstone Ltd. Edimburgh. London, 1962, 26

GRAY H.

On the development of the ductless glands in the Chick.
Phil. Trans. London, 1852, 142, 295-309.

GRIFFITHS K.

Inhibition of 19 hydroxylase activity in the golden Hamster adrenal by Su 4885.
J. Endocrinol. 1963, 26, 445-446.

- GRYNFELT E.
Sur la présence de granulations spécifiques dans les cellules chromaffines de Kohn.
C.R. Assoc. Anat., 1903, 134-142.
- HAGEN P.
Biosynthesis of norepinephrine from 3,4 dehydroxyphenyl-ethylamine (dopamine).
J. Pharmacol., 1956, 116, 26.
- HAGEN P.
The storage and release of catecholamines.
Pharmacol. Rev., 1959, 11, 361-373.
- HAGEN P., BARNETT R.J.
The storage of amine in the chromaffin cell.
Ciba Foundation symposium on adrenergic mechanisms.
1960, Churchill, Edit., London, 83-99.
- HAGEN P., WELCH A.D.
The adrenal medulla and the biosynthesis of pressor amines.
Recent. Progr. Hormone, Res., 1955, 12, 27-44.
- HAMBURGER V., HAMILTON M.L.
A series of normal stage in development of the chick embryo.
J. Morphol. 1951, 88, 49-52.
- HAMBERGER B., NORBERG K.A.
Histochemical demonstration of monoamines in fresh frozen sections.
J. Histochem., Cytochem, 1964, 12, 48-49.
- HAMMOND W.S. YNTEMA C.L.
Depletions in the thoraco-lumbar sympathetic system following removal of neural crest in the Chick.
J. Comp. Neural, 1947, 86, 237-265.
- HANKE W., WEBER K.
Physiological activity and regulation of the anuran adrenal cortex (Rana temporaria L.)
Gen. Comp. Endocrinol., 1965, 4, 662-72.
- HAYES E.R.
A rigorous re definition of the plasmal reaction.
Stain Technol., 1949, 24, 19-23.
- HARRIS M.A.
Observation on the origin of the adrenal glands in the Chick.
Inaug. Diss. Univ. Chicago, 1928, 30p.
- HARTMAN F.A.
1929. Cité par HARMAN et BROWNELL 1949.
- HAYS V.J.
The development of the adrenal glands of birds.
Anat. Record. 1914, 8, 451-474.
- HENLE J.
Das Gewebe der Nebenniere und der Hypophyse.
Zeitsch. F. Rat. Med., 1865, 24, 143-52.

- HERLANT M., KLASTERSKY J.
Etude au microscope électronique des cellules corticotropes de l'hypophyse.
C.R. Assoc. Anat., 1963, 118, 720-729.
- HERLANT M., PASTEELS J.L.
Identification expérimentale des cellules responsables de la sécrétion de prolactine chez le Rat.
C.R. Acad. Sci., 1959, 249, 2625-2626.
- HERMANN H., PEYRIN L., CIER J.F.
Rôle de l'acétylcholine dans la méthylation de la noradrénaline.
C.R. Acad. Sci., 1963, 256, 4791-4796.
- HERRMANN M., LAUTENSCHLAGER J., MEUSER P.J., STEIN B.
Zum Verhalten einiger Fermente in der Nebennierenrinde der Meerschweinchen nach ACTH. Cortison - Metopiron und Trijodthyronin- Behandlung.
Anat. Anz. Dtsch., 1967, 120, 475-81.
- HILLARP N.^oA.
The release of catecholamines from the amine containing granules of the adrenal medulla.
Acta. Physiol. Scand., 1958, 43, 292-302.
- HILLARP N.^oA.
Further observations on the state of the catecholamines stored in the adrenal medullary granules.
Acta. Physiol. Scand., 1959, 47, 271-279.
- HILLARP N.^oA.
Some problems concerning the storage of catecholamines in the adrenal medulla.
1960. Ciba. Foundation on adrenergic mechanisms. Churchill. Edit. London, 481-486.
- HILLARP N.^oA., HOKFELT B.
Evidence of adrenalin and noradrenalin in separate adrenal medullary cells.
Acta. Physiol. Scand., 1953, 30, 55-68.
- HILLARP N.^oA., HOKFELT B.
Histochemical demonstration of noradrenaline and adrenaline in the adrenal medulla.
J. Histochem. and Cytochem., 1955, 3, 1-5.
- HIS W.
Untersuchungen über die erste Anlage der Wirbelnierenleibes. Die Erste Entwicklung der Hühnchens im Ei, 1868, F. C. W. Vogel, Leipzig 237p.
- "
HOKFELT B.
Noradrenaline and adrenalin in Mammalian tissues.
Acta. Physiol. Scand. 1951, 25, suppl., 92.

HOLTZ P.

Dopadecarboxylase.

Naturwissenschaften, 1929, 27, 724-725.

HOLZBAUER M., VOGT M.

Depression by reserpine on the concentration of noradrenaline in the hypothalamus of the Cat.

J. Neurochem., 1956, 1, 8-11.

HOPSU V.K., MAKINEN E.O.

Two methods for the demonstration of noradrenalin containing adrenal medullary cells.

J. of Histochemistry, 1966, 14, 434-435.

IDELMAN S.

Contribution à la cytophysiologie infra-structurale de la cortico-sur-rénale chez le Rat albinos.

Ann. Sci. Nat. Zool. Paris, 1966, 8, 205.

JANOSIK J.

Bemerkungen über die Entwicklung der Nebenniere.

Arch. F. mikr. Anat., 1883, 22, 738-746.

JENKINS J.S., MEAKIN J.W., NELSON D.H.

A comparison of the inhibitory effects of 2 methyl -1,2-bis (3 pyridyl)-1-propanone and amphenone B on adrenal cortical secretion the Dog.

Endocrinology, 1959, 64, 572-578.

JENKINS J.S., MEAKIN J.W., NELSON D.H., THORN G.W.

Inhibition of adrenal steroid 11 oxygenation in the Dog.

Science 1958, 128, 478-480.

JOHANNISSON E.

The foetal adrenal cortex in the human. Its ultrastructure at different stages of development and in different functional states.

Acta. Endocrinol. 1968, Suppl. 130

JOST A.

Problems of fetal endocrinology : the adrenal glands.

Recent. Progr. Hormone, Res. U.S.A., 1966, 22, 541-74.

JOST A., ROFFI J.

Compt. Rend. 1958, 246, 163.

JOURNEY L.J.

Cytoplasmic microtubules in mouse peritoneal macrophages during rejection of MC 1M ascites + tumor cells.

Cancer, Res., 1964, 24, 1391-1405.

KAHRI A.J.

Histochemical and electron microscopic studies on the cells of Rat adrenal Cortex in tissue culture.

Acta. Endocr., 1966, 52, suppl. 108.

KAHRI A.J.

Effects of actinomycin D and puromycin on the ACTH induced ultrastructural transformation of mitochondria of cortical cells of Rat adrenals in tissue culture

J. Cell. Biol. U.S.A., 1968, 36, 181-95.

KAISERLING, ORGLER.

1900. Cité d'après DA COSTA 1952.

KANE R.E.

The mitotic apparatus. Fine structure of the isolated unit.
J. Cell. Biol., 1962, 15, 279-287.

KANO M.

Electron microscopic study on the adrenal medulla of domestic fowl.
Arch. Histol. Japon, 1959, 18, 25-56.

KAR A.B.

The adrenal cortex particular relations in the fowl : the affect of castration and replacement therapy on the adrenal cortex.
Anat. Record. 1947, 99, 177-198.

VAN KEMENADE J.A.

The effect of metopirone and aldactone on the interrenal tissue of intact and Pars distalisectomized common frog, *Rana temporaria*.
Z. Zellforsch. Mikr. Anat., 1968, 92, 567-82.

KERSTEN H., LEONHAUSER S., STAUDINGER H.J.

Biochem. Biophys. Acta., 1958, 29, 350.

KERSTEN W., SCHMIDT H., STAUDINGER H.J.

Biochem. Z. 1955, 326, 469.

KHAZAN N., SULMANN F.G., WINNIK H.Z.

Activity of pituitary adrenal cortex axis during acuto and chronic reserpine treatment.
Proc. Soc. Exp. Biol. a Med., 1961, 106, 579-581.

KIRSHNER N.

Formation of adrenaline and noradrenaline.
Ciba Foundation, symposium on adrenergic mechanism, Churchill, Edit. London, 1960, 17-27.

KIRSHNER N., Mac GOUDALL.

Separation of adrenaline, noradrenaline and hydroxytyramines by ion exchange chromatography.
J. Biol. Chem., 1957, 226, 207-212.

KIRSHNER N.

Uptake of catecholamines by a particulate fraction of the adrenal medulla.
1962, Science, 135, 107-108.

KITCHELL R.L., WELLS L.J.

Anat Record, 1952, 112, 161.

KJAERHEIM A.

Studies of adrenocortical ultrastructure. II The interrenal cell of the domestic fowl as seen after glutaraldehyde perfusion. fixation.
Z. Zelforsch. mikr. Anat. Dtsch., 1968 a, 91, 429-55.

^o
KJAERHEIM A.

Studies on adrenocortical ultrastructure. Effects of ACTH on interrenal cells of the domestic fowl.

J. micr. Fr., 1968 b, 7, 715-38.

KJAERHEIM A.

Studies of adrenocortical ultrastructure. V - Effects of Metopiron on interrenal cells of the domestic fowl.

J. Micr. Fr., 1968 d, 7, 739-54.

^o
KJAERHEIM A., KONDICS L.

Ultrastructure of the interrenal cells in the hen.

Journal of ultrastructure Research, 1966, 14, 419.

KLEIN U., KRACHT J.

Über Hormon Bildungsstätten im Nebennierenmark.

Endokrinologie, 1957, 35, 259-280.

KLUVER, BARREIRA.

1953. Cité d'après PEARSE 1960.

KNOUFF R.A., HARTMANN F.A.

A microscopic study of the adrenal of the brown Pelican.

Anat. Rec., 1951, 109, 161-188.

^o
KONDICS L., KJAERHEIM A.

The zonation of interrenal cells in fowls (an electron microscopical study).

Z. Zellforsch. mikr. Anat., 1966, 70, 81.

KONSCHEGG T.

Ursachen der hypertonic.

Wiener klin. Wschr., 1940, 269-273.

KUTSCHERA., AICHBERGEN H.

Die Überfunktion und die Unterfunktion der Nebennieren.

Schweiz. Med. Wschr., 1948, 78, 135-140.

LAIGNEL LAVASTIN.

1905. Cité par GABE 1968.

LE DOUARIN N., TEILLET M.A.

Localisation par la méthode des greffes interspécifiques du territoire neural dont dérivent les cellules adrénales surrénaliennes chez l'embryon d'Oiseau.

C.R. Acad. Sc., 1971, 272, 481-484.

LENTZ T.L.

Rhabdite formation in planaria : the role of microtubules.

J. Ultrastruct. Res., 1967, 17, 114-126.

LEVER J.D.

Electron microscopic observations on the adrenal cortex.

Amer. J. Anat., 1955, 97, 409-429.

LEVER J.D.

Cytological studies on the hypophysectomized Rat adrenal cortex : alteration of its fine structure following ACTH administration and on lowering the Na/K ratio.

Endocrinology, 1956, 58, 163-180.

LEVIN E.Y., LEVENBERG B., KAUFMAN S.

The enzymatic conversion of 3,4 dehydroxyphenyl - ethylamine to norepinephrine.

J. Biol. Chem., 1960, 235, 2080-2086.

LEVY H., DEANE H.W., RUBIN B.L.

Visualisation of steroid 3 β oldehydrogenase activity in steroid producing glands.

J. Histochem. Cytochem., 1959, 7, 320.

LEYDIG F.

Anatomisch-histologisch Untersuchungen über Fische und Reptilien.
Reimer. Berlin, 1853.

LILLIE

Development of the Chick.

1952. B.H. WILLIER Edt. New-york.

LISON L.

Histochimie et cytochimie animales.

1960. Gauthier Villars.

LONG J.A., JONES A.L.

The fine structure of the Zona Glomerulosa and the Zona Fasciculata of the adrenal cortex of the Opossum.

Am. J. Anat., 1967, 120, 463-487.

LONG J.A. JONES A.L.

Alterations in fine structure of the Opossum Adrenal Cortex Following Sodium deprivation.

Anat. Rec., 1970, 166, 1.

LUFT J.H.

Improvements in epoxyresin embedding methods.

J. Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 2, 409.

LUSE S.A.

Electron microscopic observations on the adrenal gland.

In : The adrenal cortex ed. by H. D. Moon, pp46-69, New-York : Paul Hoeber, Inc, 1961.

LUSE S.A.

Fine structure of adrenal cortex.

In : The adrenal cortex (A.B. Eisenstern), London, J. and A. Churchill 1967.

- MAC KERNNS K.W.
Functions of the adrenal cortex.
Amsterdam, North Holland publishing compagny, 1968, 2 vol., 1176p.
- MAICKEL R.P., WESTERMANN E.O., BRODIE B.B.
Effects of Reserpine on cold. Exposure an pituitary, adrenocortical function in Rats.
J. Pharmacol. Exp. Therap., 1961, 134, 167-175.
- MAGALHAES M.C., MAGALHAES M.M.
A stereologic study of the effects of Metopiron on the Rat adrenal.
Lab. Invest. U.S.A., 1969, 21, 491-6.
- MAYER
1912. Cité d'après DA COSTA 1952.
- MAZINA T.I.
Frziol. Zh. SSSR., 1963, 49, 589.
- MESS B., STRAZNICKY K.
Differentiation and function of the hypophyseal-target organ system in Chicken embryos.
Stud. Biol. Acad. Sci. Hung., 1970, 9, 1-100
- MEZHVIN F.I.
Development of adrenals in Chick.
Anat. Physiol. Embrio., 1969, 12, 46-52.
- MICHEL-BECHET M., COTTE G., HAON A.M.
Etude ultrastructurale de la médullosurrénale du Hamster.
J. Microscopie, 1963, 2, 449-460.
- MICHEL-BECHET M., COTTE G., HAON A.M.
Modification ultrastructurale de la médullosurrénale du Hamster doré , après injection de réserpine.
J. Microscopie 1964, 3, 45.
- MIETKIEWSKI K., MALENDOWICZ L.
Über Veränderungen der Nebennierenrinde bei Ratten nach Behandlung mit Metopiron.
Endokrinologie Dtsch, 1965, 48, 241-55.
- MIHALKOVICS (Von) G.V.
Die Anlage der Zwischenniere bei der europäischen Sumpfschildkröte nebstallgemeinen Bemerkungen über die Stammes und Entwicklungsgeschichte des Interrenal-systems der Wirbeltiere.
Internat. Monatschr. Anat. Hist., 1885, 2, 387-414.
- MILLER R.A., RIDDLE O.
The cytology of the adrenal cortex of normal Pigeons and in experimentally induced atrophy and hypertrophy.
Amer. J. Anat., 71, 311-341.
- MINERVINI R.
Des capsules surrénales. Développement , structure, fonctions.
1904, 40, 449-492.
- MIRKIN B.L.
The effect of synaptic blocking agents adrenal medullary and urinary catecholamine levels.
J. Pharmacol. Exp. Therap., 1961, 133, 34-40

MONNERON A.

Variations histologiques expérimentales de la médullosurrénale du Hamster.

Thèse Med., Marseille, 1963.

MOOG F., FORD E.

Influence of exogenous ACTH on body weight, adrenal growth, duodenal phosphatase and liver glycogen in the Chick embryo.

Anat. Rec., 1957, 128, 592.

MUELLER J.M., SCHLITTE E., BEIN H.J.

Reserpin, der sedative Wirkstoff aus Rauwolfia serpentina Benth.

Experientia, 1952, 8, 338.

MULLER J.

Die Nebennieren von Gallus domesticus und Columba livia domestica.

Z. Mikroskop. Anat. Forsch., 1929, 17, 303-352.

MULON P.

Spécificité de la réaction chromaffine.

C.R. Soc. Biol., 1904, 56, 113.

MUSCHOLL E., VOGT M.

The action of reserpine on the peripheral sympathetic system.

J. Physiol., 1958, 141, 132-155.

NAGRA C.L., SAUMERS A.K., WITTMAYER H.N.

Effects of testosterone, progestagens, and Metopirone on adrenal activity in Cockerels.

Gen.Comp. Endocrinol. U.S.A., 1965, 5, 69-73.

NAGRA C.L., BAUM G.J., MEYER E.K.

Corticosterone level in adrenal efferent blood of some gallineous birds.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1960, 105, 68-70.

NAGRA C.L., BIRNIE J.G., BAUM G.J., MEYER R.K.

The role of the pituitary in regulating steroid secretion by the avian adrenal.

Gen. Comp. Endocrinol., 1963, 3, 274-280.

NEWCOMER W.S.

Reserpin and adrenocortical function in chickens.

Ann. J. Physiol., 1962, 202, 337-339.

NISHIKAWA M., MURONE I., SATO T.

Electron microscopic investigations of the adrenal cortex.

Endocrinology, 1963, 72, 197-209.

OGATA T.

Über die Henlesche Chromreaktion der sogenannten chromaffinen Zellen und den mikrochemischen Nachweis des Adrenalins.

Beitr. Path. Anat., 1923, 71, 376-387.

OKUDA M.

Endocrinology, 1928, 12, 342-348.

- OLIVEREAU M., BALL J.N.
Fonction corticotrope et cytologie hypophysaire chez deux Téléostéens :
Mollienesia latipinna le Sueur et *Anguilla anguilla* L.
Compt. Rend. Acad. Sci., 1963, 256, 3766-3769.
- PALADE G.E.
Studies on the endoplasmic reticulum. II - Simple disposition
in cells in situ.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1955, 1, 567-582.
- PASTEELS J.L.
Comparaison entre l'action des androgènes et la réserpine sur
l'hypophyse et la glande mammaire chez le Rat.
Ann. Endocrinol., 1961, 22, 257-268.
- PEARSE A.G.E.
Histochemistry. Theoretical and applied.
Churchill, London, 1960, 998p.
- PEDERNERA E.A.
Differentiation in vitro of Chick embryo adrenal glands.
Experimentia, 1968, 24, 938-939.
- PEDERNERA E.A.
Development of the secretory capacity of the Chick embryo adrenal
glands.
J. Embryol. Exp. Morphol., 1971, 25, 213-222.
- PENNEY D.P., AVERILL K.
Effects of chronic administration of Su 4885 and recovery on the Rat adrenal
cortex.
Anat. Rec., 1971, 169, 398.
- PENNEY D.P., BARNETT R.J.
The fine structural localization and selective inhibition of nucleo-
sidephosphatases in the Rat adrenal cortex.
Anat. Rec., 1965, 152, 265-77.
- PHILLIPS J.G., CHESTER JONES I.
The identity of adrenocortical secretions in lower Vertebrates.
J. Endocrinol., 1957, 16, 111.
- PICARD D.
Sur le cycle sécrétoire de la cellule adrenalinogène dans la médullo-
surrénale.
16ème Réun. Anat. Univ. Suisses, Zurich, in Schweiz, Med. Wschr., 1951,
81, 778-779.
- PICARD D., VITRY G.
Cytophysiology of the medullary adrenal cell.
Arch. Biol., 1964, 75, 453-496.

- PICON R.
Recherches histochimiques sur la médullosurrénale foetale du Lapin.
Arch. Anat. micr., 1964, 53, 343-356.
- RABL H.
Die Entwicklung und Structur der Nebennieren bei den Vögeln.
Arch., f. mikr. Anat., 1891, 38, 492-523.
- RACADOT J.
L'action de la réserpine sur le lobe antérieur de l'hypophyse du Cobaye.
Anat. Anz., 1960, 109, 604-608.
- RAU A.S., JOHNSON P.H.
Observations on the development of the sympathetic nervous system and suprarenal bodies in the Sparrow.
Proc. Zool. Soc. London, 1923, 741-768.
- REMAK R.
Untersuchungen über die Entwicklung des Wirbeltierreichs.
G. Reimer Berlin, 1855, 195p.
- RESKO J.A., NORTON H.W., NALBANDOV A.V.
Endocrine control of the adrenal in chickens.
Endocrinology, 1964, 75, 192-200.
- REYNOLDS E.S.
The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.
J. Cell. Biol., 1963, 17, 208-212.
- RHODIN J.A.G.
The ultrastructure of the adrenal cortex of the Rat under normal and experimental conditions.
J. Ultrastructur. Res. U.S.A., 1971, 34, 23-71.
- ROBERTIS (de) E., SABATINI D.
Mitochondrial changes in the adrenal cortex of normal Hamsters.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1958, 4, 667-670.
- ROBERTIS (de) E., SABATINI D.
Fed. Proc., 1960, suppl. 5, 19, 70-78.
- ROBERTIS (de) E., VAZ FERREIRA A.
Electron microscope study on the excretion of catechol - containing droplets in the adrenal medulla.
Exp. Cell. Res., 1957, 12, 568-574.
- ROFFI J.
Influence de la corticosurrénale sur le contenu en adrénaline et noradrénaline de la surrénale chez le foetus de Rat.
C.R. Acad. Sci. Paris, 1965, 260, 1267-1270.
- ROFFI J., CHEOUX G., COHEN A., JOST A.
Evolution du taux d'adrénaline dans les surrénales chez les foetus de Lapin et de Rat. Rapports avec la corticosurrénale.
J. Physiol. Paris, 1965, 57, 690-691.

ROMANOFF A.

The Avian Embryo. Structural and Functional development .
The Mac Millan Compagny, New-York, 1960.

ROOS (de) R.

In vitro production of corticoids by chicken adrenals.
Endocrinol. 1960, 67, 719.

ROOS (de) R.

The corticoids of the avian adrenal gland.
Gen. Comp. Endocr., 1961, 1, 494-512.

ROOS (de) R., ROOS (de) C.C.

Effects of mammalian corticotropin and chicken adenohypophysial extracts on
steroidogenesis by chicken adrenal tissue in vitro.
Gen. Comp. Endocr., 1964, 4, 602-607.

ROSENFELD G., LEEPER L.C., UDENFRIEND S.

Biosynthesis of norepinephrine and epinephrine by the isolated calf adrenal.
Arch. Biochem., 1958, 74, 252-265.

ROSS M.H.

In : CURRIE A.R. Symington T. and Grant J.K. Eds.
The Human adrenal cortex, Livingstone Ltd, Edinburgh at London 1962, 588.

SABATINI D.D., ROBERTIS (de) E.D.P.

Ultrastructural zonation of adrenocortex in the Rat.
J. Biophys. Biochem. Cytol. U.S.A., 1961, 2, 105-19.

SABATINI D.D., ROBERTIS (de) E., BLEICHMAR H.B.

Submicroscopic study of the pituitary action on the adrenocortex
of the Rat.
Endocrinology 1962, 70, 390-406.

SAMUELS L.T., UCHIKAWA T.

Biosynthesis of adrenal steroids in the Adrenal Cortex, A.B.
Eisenstein ed. J. and A.
Churchill. London, 1967, 61-102.

SCHUMANN H.J.

Die Wirkung von Insulin und Reserpin auf den Adrenalin und ATP Gehalt
der chromaffinen Granula des Nebennierenmarks.
Arch. Exp. Path. Pharmacol., 1958, 233, 237-249.

SCHUMANN H.J.

Medullary particles.
Pharmacol. Rev. U.S.A., 1966, 18, 433-8.

SCHUMANN H.J.

Formation and inactivation of adrenergic transmitter.
Ciba Foundation symposium on adrenergic mechanisms, Churchill, Edit.,
London, 1960, 6-16.

SCHWARZ W., MERKER H.J., SUCHOWSKY

Electronen mikroskopische Untersuchungen über die Wirkungen von ACTH und
Stress auf die Nebennierenrinde der Ratte.
Virchows, Arch. Path. Anat., 1962, 335, 165-179.

SCHWARZ W., SUCHOWSKY G.K.

Die Wirkung von Metopiron und Amphenon B auf die Nebennierenrinde der Ratte.

Virchow's Arch. Path. Anat., 1963, 337, 270-278.

SEMON R.

Die indifferente Anlage der Keimdrüsen beim Hühnchen und ihre Differenzierung zum Hoden.

Anat. Anz. Jena, 1890, 5, 455-482.

SHAEPDRYVER (de) A., PREZIOSI P.

Modificazioni da insulina e reserpina del colesterolo del surrene con o senza pretattamento iponiazidico.

Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1959, 35, 327-331.

SHARAWY M., PENNEY D.P.

Alterations of the fine structure of the Rat adrenal after administration of Metopirone.

Anat. Rec., 1969, 163, 325.

SHEPHERD D.M., WEST G.D.

Noradrenaline and the adrenal medulla.

Brit. J. Pharmacol., 1951, 6, 665-674.

SHEPPARD H., SWENSON R., MOWLES T.F.

Steroid biosynthesis by Rat adrenal : functional zonation.

Endocrinology, 1963, 73, 819-24.

SHERIDAN M.N., BELT W.D., HARTMANN F.A.

The fine structure of the interrenal cells of the brown Pelican.

Acta. Anat. Basel, 1963, 53, 55-65.

SIEKEWITZ P., PALADE G.E.

J. Biophys. Biochem. Cytol., 1958, 4, 557.

SIMON J.

A physiological essay on the thymus gland.

H. Renshaw, London, 1845.

SINHA D., GHOSH A.

Some aspects of adrenocortical cytochemistry in the domestic Pigeon.

Endocrinology, 1961, 40, 270-280.

SINHA D., GHOSH A.

Cytochemical study of the suprarenal cortex of the Pigeon under altered electrolytic balance.

Acta. Histochem. Jena, 1964, 222-229.

SIVARAM S.

Structure and development of the adrenal gland of Gallus domesticus.

J. Zool. Canad., 1965, 43, 1021-1031.

SIVARAM S.

Histochemistry of the developing adrenal gland of the Chick.

Anat. Rec., 1964, 148, 336.

SIVARAM S.

Histochemical studies on the developing adrenal gland of *Gallus domesticus*.
Histochem. Dtsch., 1968, 12, 316-25.

SIVARAM S.

Nature and distribution of lipids in the developing adrenal cortex of
Gallus domesticus.

Acta. Histochem., 1969, 32, 253-261.

SMITH R.E., FARQUHAR M.G.

Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells
of the anterior pituitary gland.

J. Cell. Biol., 1966, 31, 319-347.

SOSA J.M.

Rev. Sudamer. Morphol., 1948, 6, 115.

SOULIE E.H.

Recherches sur le développement des capsules surrénales chez les
Vertébrés supérieurs.

J. Anat. Physiol., 1903, 39, 197-293.

STEIGER M., REICHSTEIN T.

Desoxy-cortico-steron (21 oxyprogesteron) aus Δ^5 3 oxy-atio-cholensaure.
Helv. Chim. acta., 1937, 20, 1164.

STOLL R., FAUCOUNAU N., MARAUD R.

Nouvelles données sur la fonction surrénalienne de l'embryon de Poulet
étudiée à l'aide de la Métopirone (SU 4885).

C.R. Soc. Biol., 1964, 158, 1866-1868.

STOLZ F.

Ueber Adrenalin und Alkylaminoacetobenzkatechin.

Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1904, 37, 4149-4153.

SUN T.P.

Histo-physiogenesis of the glands of interrenal secretion thyroid, adrenal,
parathyroid and thymus of the Chicken embryo.

Physiol. Zool., 1932, 5, 384-396.

SWINGLE W.W., PFIFFNER J.J.

Studies on the adrenal cortex. I - The effect of a lipid fraction
upon the life span of adrenalectomized Cats.

Amer. J. Physiol., 1931, 96, 153-163.

SYMINGTON T.

The morphology of the adrenal cortex. The biosynthesis and secretion
of adrenocortical steroids.

18th, Biochem. Soc. Symp. Univ. Press., Cambridge 1960, 40-49.

SYMINGTON T.

In : Currie A. R. SYMINGTON T. and GRANT J.K. Eds. The Human adrenal
Cortex, Livingston Ltd. Edimburgh & London 1962, 3

SZABO D.E., STARK E., VARGA B.

The localisation of acid phosphatase activity changes in lysosomes in
the adrenal Zona fasciculata of intact and hypophysectomized Rats fol-
lowing ACTH administration.

Histochem., 1967, 10, 321-328.

SZCZEPISKI O., GONCERZEWICZ M., WALCZAK M., SOCHA J., WARCHOL J.
L'effet de la Métopirone sur le cortex surrénalien des Rats.
Endokrynol. Polska., 1967, 18, 581-90.

SZENT GYORGYI A.
Nature 1932, 129, 943.

TAKAMINE
Adrenalin the active principle. of the suprarenal glands.
Amer. J. Pharmacol., 1901, 73.

TEMPLE T.E., LIDDLE G.W.
Inhibition of adrenal steroid biosynthesis.
Ann. Rev. Pharmacol., U.S.A., 1970, 10, 199-218.

TIXIER-VIDAL A., ASSENMACHER J.
Action de la Métopirone sur la prehypophyse du Canard mâle : essai
d'identification des cellules corticotropes.
C.R. Soc. Biol., 1963, 157, 1350-1354.

TRAMEZZANI J.H., CHIOCCHIO S.R. WASSERMANN G.F.
A technique for light and electron microscopic identification of
adrenalin and noradrenalin storing cells.
J. Histochem. Cytochem., 1964, 12, 890-899.

TUCHMANN - DUPLESSIS H.
Repercussion de la réserpine sur le système hypophyso-génital.
Gazette des Hôpitaux, 1958, 28, 961.

TUCHMANN - DUPLESSIS H., MERCIER - PAROT L.
Etude comparative de l'action de la réserpine et d'un de ses esters, la
syrosingopine, sur le tractus génital et les glandes endocrines de la
Ratte.
C.R. Acad. Sci., 1960, 251, 800-802.

URIST M.A., DEUTSCH N.M.
Influence of ACTH upon avian species and osteoporosis.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1960, 104, 35-39.

VALENTI G.
Sullo sviluppo della capsula surrenali nel pollo ed in alcuni Mammiferi.
Atti della Societa Toscana di Scienze Naturali, 1889, 10.

VINET A.
Recherches sur l'origine biochimique de l'adrénaline.
Thèse de Sciences, Paris.

VITRY G.
Etude cytochimique et cytophysiologique des types cellulaires de la
médullosurrénale des Mammifères.
Thèse Doct. Sci. Nat. S. I. 1966, Paris.

VITRY G.

Les catécholamines et la méthylation de la noradrénaline dans les deux catégories cellulaires de la médullosurrénale de la Vache.
Revue française d'études chimiques et biologiques, 1967, 12, 821-827.

VITRY G., CHAMBOST G., DURAND S.

Phosphatases alcalines et dimorphisme cellulaire dans la médullosurrénale.
Ann. Histochem. Fr., 1960, 5, 313-9.

VULPIAN A.

Note sur quelques réactions propres à la substance des capsules surrénales.
C.R. Acad. Sci. Paris, 1856, 43, 633.

VOTH D., TIETZE K.W., KOHLHARDT M., REICHELT A.

Zur Wirkung von Angiotensin II auf die Nebennierenrinde bei Blockade der 11β hydroxylierung.
Z. Ges. Exp. Med., 1964, 138, 197-213.

WALDEYER W.

Eierstock und Ein Beitrag zur Anatomie und Entwicklungsgeschichte der sexual organe.
Wilhelm, Engelmann, Leipzig, 1870, 174p.

WASSERMANN G.F., BERNARD E.A.

Adrenaline content of the Chick embryo adrenal gland during development.
Acta. Physiol. latino. Amer. Argent., 1970, 20, 171-3.

WATTENBERG L.W.

Microscopic histochemical demonstration of steroid 3β ol dehydrogenase in tissue sections.
J. Histochem. Cytochem., 1958, 6, 225-232.

WELDON W.F.R.

Note on the origin of the suprarenal bodies of Vertebrates.
Proc. Roy. Soc. London, 1885, 37, 422-425.

WESTERMANN E.

Stimulierung und blockierung des hypophysen Nebennierenrinden Systems durch reserpin.
Arch. Exp. Path. Pharmacol., 1961, 241, 518-519.

WETZSTEIN R.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Nebennierenmark von Maus Meerschweinchen und Katze.
Z. Zellforsch., 1957, 46, 517-576.

WILLIER B.H.

A study of the origin and differentiation of the suprarenal gland in the Chick embryo. by chorio-allantoid grafting.
Physiol. Zool., 1930, 3, 201-225.

WILLIER B.H.

Phases in embryonic development.
J. Cell. Comp. Physiol., 1954, 43, suppl. 1, 307-317.

WOOD J.G.

Identification of and observation on noradrenalin an adrenalin containing cells in the adrenal medulla.

Anat. Rec., 1962, 142, 292.

WOOD J.G.

Identification of and observation on epinephrine and norepinephrine containing cells in the adrenal medulla.

Ann. J. Anat., 1963 a, 112, 285-304.

WOOD J.G., BARNETT R.J.

Histochemical demonstration of norepinephrine at a fine structural level.

J. Histochem. Cytochem., 1964, 12, 197-209.

WURTMAN R.J., AXELROD J.

Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroid.

J. Biol. Chem., 1966, 241, 2301-2305.

YAMORI T., MATSURA S., SAKAMOTO S.

An electron microscopic study of the normal and stimulated adrenal cortex in the Rat.

Z. Zellforsch. mikr. Anat. Dtsch., 1961, 55, 179-99.

YATES R.D.

An electron microscopic study of the effects of reserpine on adreno-medullary cells of the syrian Hamster.

Anat. Rec., 1963, 146, 29-45.

YATES R.D.

A light and electron microscopic study correlating the chromaffin reaction and granule ultrastructure in the adrenal medulla of the syrian Hamster.

Anat. Rec. U.S.A., 1964, 149, 237-49.

YATES R.D.

Fine structural observations on untreated and ACTH treated adrenocortical cells of the zona reticularis of syrian Hamsters.

Z.Zellforsch., 1965, 66, 384.

YATES R.D., WOOD J.G., DUNCAN D.

Phase and electron microscopic observations on two cell types in the adrenal medulla of the syrian Hamster.

Tex. Rep. Biol. Med., 1962, 20, 494-502.

ZELANDER T.

The ultrastructure of the adrenal cortex of the mouse.

Z. Zellforsch., 1957, 46, 710-716.

ZELANDER T.

Ultrastructure of mouse adrenal cortex. An electron microscopical study of intact and hysrocortisone treated male adults.

J. Ultrastruct. Res. Suppl. 2, 1959, 1-111.

NOM DE L'ETUDIANT : Madame HATIER Renée

Nature de la thèse : Doctorat ès Sciences Naturelles

Vu, Approuvé

et permis d'imprimer

NANCY, le 12 juin 1972

Le Président du Conseil de l'Université de NANCY I

